Zentralinstitut für Biochemie und Biophysik
der Freien Universität Berlin

KONTAKTINHIBITIONSVERLAUF BEI SÄUGERZELLEN

Untersuchungen mit automatisierten Methoden

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Burger Zapf
aus Braunschweig

1975

Zentralinstitut für Biochemie und Biophysik
der Freien Universität Berlin

KONTAKTINHIBITIONSVERLAUF BEI SÄUGERZELLEN

Untersuchungen mit automatisierten Methoden

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Burger Zapf
aus Braunschweig

1975

Referent: Prof. Dr. P. Schmialek † / Priv. -Doz. Dr. Dr. M. Schweiger
Korreferent: Prof. Dr. K. O. Habermehl

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche der
Freien Universität Berlin

Promoviert am: 23.6.1975

Druck: Zentrale Universitätsdruckerei, V a A 4

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	Einleitung	6
2.	Material und Methodik	13
2.1	Zellkulturen	
2.1.1	Ausgangsmaterial	13
2.1.2	Medien	13
2.1.3	Zellklonisierung	13
2.1.4	Zellzüchtung	14
2.1.5	Fixierung und Färbung	15
2.1.6	Zellzählung	15
2.2	Transformation und Malignitätstest	
2.2.1	Spontane Transformation	15
2.2.2	Transformation mit canzerogenen Aromaten	16
2.2.3	Bestimmung der Tumorbildungsrate verschiedener Hamsterzellinien im Mäuseversuch	16
2.3	Markierung und Autoradiographie	
2.3.1	Markierung	19
2.3.2	Autoradiographie	19
3.	Zählapparatur für Zellen in Petrischalen	20
3.1	Problemstellung	20
3.2	Prinzip der Zählapparatur	20
3.3	Aufbau und Funktion der Zählapparatur	21
3.3.1	Konstruktion des Schalendrehtisches	22
3.3.2	Aufnahmeelektronik zur Zellregistrierung.	27
3.3.3	Beseitigung von Störfaktoren im optischen System.	29

Seite

3.4 Funktionsprüfung der Apparatur

3.4.1 Einfluß des Abbildungsmaßstabes 30

3.4.2 Einfluß der Scharfeinstellung auf die Nutzimpulse 34

3.4.3 Optimale Abstimmung der variablen Zählapparaturparameter 35

3.4.3.1 Lampenspannung 35

3.4.3.2 Vorschub 38

3.4.3.3 Triggerschwelle des Zählers 40

3.4.4 Dynamische Triggerschwellen-Anpassung .. 41

3.4.5 Abschlußtest mit Eichschalen 41

4. Entwicklung eines Chemostaten 44

4.1 Kulturgefäß

4.1.1 Gefäß 46

4.1.2 Temperieren 46

4.1.3 Verschlüsse 47

4.1.4 Filter 47

4.1.5 Rührer 47

4.1.6 Rückflußkühler 48

4.2 Begasung und pH Kontrolle 48

4.3 Mediumwechsel 49

4.4 Probenentnahme 52

5. Zeitlicher Verlauf der Kontaktinhibition 54

5.1 Vorversuche

5.1.1 Einsaattechnik von Zellen 54

5.1.2 Kontrolle der Stationärphase 55

Seite

5.2 Hauptversuch

5.2.1 Kontaktinhibition 58

5.2.2 Untersuchung eventueller Störfaktoren 62

5.2.2.1 Berechnung der Sauerstoffdiffusion 62

5.2.2.2 Sauerstoffkonzentrationsmessung in der Petrischale 68

6. Diskussion 71

6.1 Allgemeine Problematik 71

6.2 Chemostat 72

6.3 Zählapparatur 75

6.4 Zeitlicher Verlauf der Kontaktinhibition 79

7. Zusammenfassung 82

8. Literaturverzeichnis 83

1. Einleitung

Die Aufklärung der Ursache des Krebses ist bisher deshalb nicht gelungen, weil zwei grundsätzliche Fragen des malignen Wachstums noch unbeantwortet sind,nämlich:

1) Wie ist der intrazelluläre Mechanismus beschaffen, der das Wachstum der Zelle generell kontrolliert ?
2) Wie und an welcher Stelle ändern die bekannten krebserzeugenden Prinzipien diesen Mechanismus, führen zu unkontrolliertem Wachstum über die Organgrenzen hinaus, zu Metastasenbildung und damit zum Tode?

Die Kontaktinhibition der Zellteilung ist ein Phänomen, das eine unmittelbare Beziehung zur Regulation der Vermehrung normaler- und Krebszellen hat. Die Aufklärung dieser Wechselwirkung zwischen den Zellen könnte zur Lösung dieser beiden Grundfragen des malignen Wachstums führen.

Seit langem wurde mit Hilfe von Zellkulturen in vitro nach qualitativen Unterschieden zwischen normalen- und Krebszellen in der Hoffnung gesucht, auf diese Weise einen Ansatz zur Aufklärung der Regulation des Zellwachstums zu finden.
Bei diesen Vergleichsuntersuchungen bestand jedoch die Schwierigkeit, überhaupt "normale" Zellen in vitro in Kultur zu halten. An vielen Beispielen hat sich gezeigt, daß Zellen, die aus normalem Gewebe gewonnen waren, mit der Zeit spontan neoplastische Eigenschaften annahmen und nach überimpfen auf geeignete Versuchstiere maligne Tumoren bildeten (Gey et al., 1949; Sanford et al., 1950; de Bruyn, 1958).
Diese als spontane Transformation bezeichnete Änderung der Zelleigenschaften konnte schon nach einigen Wochen oder erst nach vielen Monaten auftreten (Sanford und Earle, 1954; 1958).
Aber auch der Verlust neoplastischer Eigenschaften im Verlauf jahrelanger Kultivierung wurde beschrieben (Dawe et al., 1958; Hsu, 1960; Sanford et al., 1956; de Bruyn, 1958). Allerdings läßt sich hier kaum der Verlust der tumorinduzierenden Eigenschaften gegen eine immunologische Veränderung der Zellen abgrenzen, die im homologen Versuchstier zu einer

Abstoßungsreaktion der Zellen führt ("homograft reaction" Snell, 1957). Tatsächlich sind dann auch in solchen Fällen mehrfach immunologische Differenzen zwischen Wirtstier und in vitro kultivierter Zellen gefunden worden (Hsu et al., 1957; Sanford et al., 1956).

Bei der Suche nach Stoffwechselunterschieden zwischen normalen und Krebszellen ist insbesondere die Theorie Warburgs, daß tumorbildende Zellen gegenüber normalen Zellen aerobe Glycolyse zeigen, von verschiedenen Arbeitsgruppen überprüft worden. Während einige Ergebnisse mit dieser Theorie übereinstimmen (Guminska et al., 1962; Woods et al., 1960; Demut et al., 1928; 1929; Krontowski et al., 1927; Wind, 1926), konnte sie in anderen Untersuchungen nicht bestätigt werden (Green et al., 1962; Homburg et al., 1961; Leslie et al., 1956; Weinhouse et al. ,1956). Es zeigte sich, daß bei frisch explantierten normalen Geweben die Stoffwechselparameter im Verlauf weniger Tage sehr stark schwankten (Harris, 1956; Agol et al., 1959; de Bruyn, 1961; Gershanovitch et al., 1958; Paul et al., 1957; Warburg et al., 1958).
Auch die Veränderung der Kulturbedingungen in vitro führte zu radikalen Änderungen (Danes et al., 1961; Paul, 1959; 1961).
Die Vorstellung eines grundsätzlichen Unterschieds im Kohlenhydratstoffwechsel zwischen Krebs- und normalen Zellen konnte deshalb nicht mehr allgemein aufrechterhalten werden.

Bei Kultivierung von Zellen in vitro ist die Änderung des Chromosomensatzes vielfach in Beziehung zur Zelltransformation gesetzt worden (Levan et al., 1953; 1958; Hsu et al., 1959; Nowell et al. ,1960; Yerganian et al., 1961). Es zeigte sich jedoch, daß in Kulturen abnormale Chromosomensätze auftreten konnten, ohne daß die Zellen neoplastische Eigenschaften zeigen mußten (Hsu und Klatt, 1959). Daneben wurde, insbesondere bei Transformation durch Viren, auch ein Bestehenbleiben des normalen Chromosomensatzes beobachtet (Macpherson, 1963). Diese Ergebnisse legten nahe, daß es durch Zellkultivierung in vitro wohl zu einer Änderung des Chromosomensatzes kommt, jedoch keine direkte Beziehung zwischen Chromosomenabnormität und Tumorbildung der Zellen besteht.

Nach diesen im großen und ganzen enttäuschenden Ergebnissen wurde bei der Suche nach Unterschieden zwischen normalen und Krebszellen besonders die Kontaktinhibition der Zellteilung in Betracht gezogen, da sie eine direkte Beziehung zur Regulation der Zellteilung hat (Abercrombie und Heaysman, 1953).
Kontaktinhibition oder auch dichteabhängige Hemmung der Teilung bedeutet, daß nach Bildung einer konfluierenden Zellschicht im Kulturgefäß das Wachstum stoppt (Abercombi und Heaysman, 1953). Mit Zeitrafferaufnahmen konnte gezeigt werden, daß Zellen normalen Ursprungs im Moment des Membrankontaktes Bewegungen und Undulationen ihrer Zellmembran einstellen (Abercrombie und Ambrose,1958). Dieser Effekt war bei tumorbildenden Zellen weit geringer ausgeprägt (Abercrombie et al.,1957).
Die an einzelnen Zellen gemachten Beobachtungen ließen sich auch am Wachstumsverhalten von Zellpopulationen bestätigen. Tumorbildende, durch Viren transformierte Zellen erreichten je nach untersuchter Zellart bis 10 mal höhere Zelldichte als nicht transformierte Zellen (Pollak et al., 1968; Vogt und Dulbecco, 1960; Koprowski et al., 1962; Berwald und Sachs, 1963; 1965).

Dieser Konzentrationsunterschied führte zu eingehenderen Untersuchungen des Kontaktinhibitionseffektes in der Hoffnung, auf diese Weise die Ursache des malignen Wachstums aufzuhellen.
Der Wachstumsstopp durch Kontaktinhibition ist angezweifelt worden. Statt dessen sollten Änderungen im Kultivierungsmedium bei zunehmender Zellkonzentration das Zellwachstum stoppen.
Es wurden Mediumverarmung, Toxinansammlung und pH-Verschiebung als Ursache dieses Effektes angesehen (Todaro et al., 1965; Kruse et al., 1965; Ceccarini et al., 1971). Es überwiegt jedoch heute die Meinung, daß diese Faktoren das Wachstumsverhalten der Zellen zwar beeinflussen, jedoch nicht als einzige Ursache für den Wachstumsstopp angesehen werden können (Levine et al., 1965; Stoker, 1964; Schutz und Mora, 1968; Pollack et al., 1968; Gurney, 1969; Dulbecco und Stoker, 1970).

Dagegen wurde in einer Reihe von Arbeiten gezeigt, daß dieser Stopp in konfluenten Zellkulturen durch Serumzusatz (Todaro et al., 1965; Holley und Kiernan, 1968; Clarke et al., 1970; Dulbecco et al., 1970) oder durch Zusatz verschiedener Serumfaktoren aufgehoben werden konnte (Todaro et al., 1967; Dulak und Temin, 1973; Frank et al., 1970; Paul et al., 1971).

Beobachtungen mit der Zeitrafferkamera ergaben dazu, daß sich nach Zugabe von Serum die vorher fest aneinanderliegenden Zellen plötzlich voneinander lösten und begannen, sich wieder zu teilen (Baker und Humphreys, 1971). Es wird angenommen, daß Serum die Oberflächenbindungskräfte der Zellen löst. Der dadurch entstehende Verlust des Zellkontaktes soll wieder zur Zellteilung führen (Humphreys, 1971).

Neben der Frage nach Einflüssen durch äußere Kulturbedingungen auf den Kontaktinhibitionseffekt wurden diffusible Hemmfaktoren beschrieben, die von den Zellen selbst erzeugt werden und den Wachstumsstopp bewirken sollten. Die Existenz solcher Faktoren ist zur Zeit umstritten. Während einige Untersuchungen einen diffusiblen Faktor ausschließen (Levine et al., 1965; Todaro et al., 1965; Schutz et al., 1968; Abercrombie und Ambrose, 1962), wird er von anderen Untersuchern beschrieben (Beierle, 1968; Yeh und Fisher, 1969; Garcia-Giralt et al., 1970; Stoker et al., 1971; Froese, 1971).
Im Widerspruch dazu stehen Arbeiten, in denen ein wachstumsstimulierender Faktor im Medium konfluierender Zellen nachgewiesen wurde (Ichikawa et al., 1969; Stoker et al., 1967; Rubin und Rein, 1967).
Ob und inwieweit diese Stoffe Einfluß auf die Kontaktinhibition der Zellteilung haben, läßt sich aus den zum Teil widersprechenden Arbeiten noch nicht endgültig entscheiden.

Eine Reihe von Untersuchern ist sich dagegen weitgehend sicher, daß der Zellkontakt selbst die wichtige Rolle beim Wachstumsstopp spielt (Stoker und Rubin, 1967; Pollak et al., 1968; Gurney, 1969; Dulbecco und Stoker, 1970; Burger et al., 1970; Baker und Humphreys, 1971).

Dabei wird der Zellmembran bei der Signalübermittlung vom Zellkontakt bis zum Stopp der Makromolekülsynthese eine Schlüsselrolle zugeteilt. In einer großen Zahl von Arbeiten wurde deshalb dieser Einfluß auf die Kontaktinhibition unter biologischen und chemischen Aspekten näher untersucht.

Es konnte gezeigt werden, daß das Ausmaß der Kontakthemmung beim Einwirken unterschiedlicher Zellsorten eine gewisse biologische Spezifität besaß. So wurden transformierte Zellen im Gegensatz zu Zellen normalen Ursprungs nur von Zellen einer anderen Art gehemmt (Borek und Sachs, 1966).

In anderen Versuchen wurden dagegen transformierte Zellen nur von wenigen Zellarten gehemmt, im allgemeinen aber wuchsen sie von fremden Zellarten unbeeinflußt (Eagle et al., 1968; Weiss, 1970).

Erkenntnisse über die Oberflächeneigenschaften von tumorbildenden Zellen im Gegensatz zu Zellen normalen Ursprungs werden von Versuchen mit verschiedenen Pflanzenagglutininen erwartet (Concavalin A, Weizenkeimagglutinin "WGA"). Diese Substanzen wurden in der Hämatologie schon lange zur Blutgruppendifferenzierung verwendet (Boyd, 1954). Es zeigte sich, daß transformierte Zellen durch Binden größerer Mengen von Concavalin A auf ihrer Oberfläche stärker agglutinieren als die nicht transformierten Ausgangszellen (Inbar und Sachs, 196[illegible] b; Aub et al., 1963; Burger und Goldberg, 1967;1970; Gantt et al., 1969).

Diese Untersuchungen sind aber von anderen Autoren bestritten worden (Arndt-Jovin und Berg, 1971; Cline und Livingston, 1971; Ozanne und Sambrook, 1971).

Die unterschiedlichen Ergebnisse sollen möglicherweise durch Störungen bei der Lectinbindung infolge verschiedener Versuchsbedingungen entstanden sein (Noonan, 1972; Burger, 1973). Während inzwischen etwa 50 Zelllinien beschrieben worden sind, die nach Transformation eine erhöhte Lectin-Agglutinierbarkeit zeigten, gibt es offenbar auch einige Ausnahmen von diesem Verhalten (Sela et al., 1970; Robbins und Burk, 1973; Burger, 1973).

Die Ursache dieser Ausnahmen liegt wahrscheinlich im allmählichen Malignisierungsprozeß der Zellpopulation in Kultur, der die Untersuchung eindeutiger Unterschiede zwischen normalen- und Tumorzellen erschwert (Burger, 1973).

Durch kurze, milde Proteasenbehandlung von embryonalen, nicht tumorbildenden Zellen gelang es, die gleiche Oberflächenagglutinierbarkeit zu erzeugen, wie sie transformierte Zellen ohne eine solche Behandlung besaßen (Burger, 1969). Befanden sich die Zellen im Zustand der Kontaktinhibition,teilten sie sich kurz nach einer Proteasenbehandlung einmal und kehrten dann wieder ins Ruhestadium zurück (Senfton und Rubin, 1970; Burger, 1970). In diesem Stadium war dann auch die erhöhte Agglutinierung wieder verschwunden.
Darüber hinaus konnte gezeigt werden, daß der Gehalt der Zellen an cyclischem AMP nach der Proteasenbehandlung abfiel. Gab man jedoch zu kontaktinhibierten Zellen C-AMP hinzu, so konnte durch Proteasen keine weitere Zellteilung erzielt werden (Burger et al., 1972; Johnson et al., 1971; Sheppart, 1971). Der Befund des Abfalls der C-AMP Konzentration blieb nicht unwidersprochen. Es wurde sowohl ein Anstieg beschrieben (Ryand und Curtis, 1973), als auch gar keine Änderung festgestellt (Humphreys, 1972).

So wird denn auch die Rolle des C-AMP als Schlüsselsubstanz bei der Regulation der Zellteilung unterschiedlich hoch bewertet (Otten et al., 1971; Burger et al., 1972; Humphreys, 1972; Ryand et al., 1973).

Die Ergebnisse der Membranuntersuchungen wurden von Burger (1973) dahingehend zusammengefaßt, daß somatische Zellen auf ihrer Oberfläche Triggermechanismen besitzen könnten, die durch Kontakt mit anderen Zellen aktiviert, auf die Makromolekülsynthese und damit auf die Zellteilung hemmend einwirken. C-AMP soll als ein Signalüberträger im Regulationsablauf dienen.
Wie der Regulationsmechanismus der Teilung aber im einzelnen abläuft, liegt zur Zeit trotz der bereits erzielten Fortschritte im Dunkeln.

Die völlige Unklarheit der intrazellulären Abläufe der Teilungsregulation erfordert einen ganz neuen Ansatzpunkt zur Lösung dieser Frage.
In der vorliegenden Arbeit soll dazu der Kontaktinhibitionsvorgang selbst genauer untersucht werden. Mit Hilfe neuer Methoden sollen Kinetiken dieses Vorgangs bei unterschiedlich malignen Zellen erstellt werden.

Außerdem soll mit zusätzlichen automatisierten Auswertungsmethoden ein biologischer Test erstellt werden, mit dem es möglich wird, die chemische Natur eines Rezeptor - Triggersystems zu untersuchen.

2. Material und Methodik

2.1 Zellkulturen

2.1.1 Ausgangsmaterial

Von 14-tägigen Embryonen des chinesischen Streifenhamsters (Cricetulus griseus) wurden Explantatkulturen in 250 ml Falconflaschen Nr. 3040 angelegt und bei 37°C bebrütet.
Mediumwechsel erfolgte alle zwei bis drei Tage, bis ein dichter Zellrasen entstand.
Diese Kulturen dienten als Ausgangsmaterial für die Klonisierung.

2.1.2 Medien

Für alle Versuche wurde das von Ham (1965) entwickelte F 12-Medium verwendet.
Die konzentrierten Mediumbestandteile wurden einzeln bei -25° C aufbewahrt, bei Bedarf aufgetaut, verdünnt, mit $1,4 \times 10^{-2}$ Molar Bicarbonat, 30 mg/l Penicillin und 50 mg/l Streptomycin supplementiert und anschliessend sterilfiltriert (Seitz Schichtenfilter Nr. K 5 und K 7).
Die Aufbewahrung erfolgte bei 4°C nicht länger als eine Woche.

Als Mediumzusatz diente 10% Kälberserum, das bei 58°C 30 min. inaktiviert worden war. Kurz vor Gebrauch wurde der pH des fertig zusammengesetzten Mediums durch Begasen mit CO_2 auf 7,3 eingestellt.

Nach Einfüllen des Mediums in die Kulturflaschen erfolgte eine zusätzliche Begasung mit einem Luft - 5% CO_2 Gemisch.

2.1.3 Zellklonisierung

Dichte primäre embryonale Hamsterzellkulturen wurden von den Kulturflaschen mit einem Teflonschaber abgeschabt, in Medium gewaschen, bei 150 g 15 min. lang zentrifugiert und das Zellsediment in F12-Medium, dem 30 % sterilfiltriertes gebrauchtes Medium (konditioniertes Medium) zugesetzt waren, suspendiert. Die Konzentration betrug 100 Zellen/ml.

Von dieser Zellsuspension wurden mit einer Tuberculinspritze jeweils 20 µl Tropfen in Näpfe von Microtestplatten (Falcon Nr. 3034) eingebracht. Bei der Durchmusterung mit einem Umkehrmikroskop wurden Näpfe, in denen sich nur eine Zelle befand, markiert.
Bis zur Koloniebildung erfolgte die Bebrütung bei 37°C.
Nach Auswachsen von Zellinseln aus Einzelzellen wurden die Zellen mit Saline-Trypsin-Versen Lösung (STV; Marcus et al., 1956) bei 37°C; 5 sec. abgelöst.
Anschließend erfolgte die Aufnahme der Zellen in Medium und die Einsaat in Microtestplatten zur erneuten Klonisierung.

Die Zellkolonien des zweiten Klonisierungsschrittes wurden abtrypsiniert und separat in 50 mm Falconschalen (Falcon Nr. 3030) weitergezüchtet.

Nach fünf Subkultivierungen in Falconflaschen (Falcon Nr. 3024) erfolgte die Konservierung der Zellklone durch Tiefgefrieren in flüssigem Propan bei -80°C und anschließender Aufbewahrung in flüssigem Stickstoff bei -196°C (Döhner, 1961; Nagington und Greaves, 1962; Greene et al., 1969).

Dem Medium war 8% Glycerin zugesetzt (Meryman, 1957; 1962).
Das Auftauen der Zellen erfolgte durch Schütteln der Ampullen in einem 37°C Wasserbad. Zellen von jeweils 2 Ampullen wurden in 20 ml Medium verdünnt und in Falconflaschen eingesät.

Die aus dem oben beschriebenen Klonisierungsschritt hervorgegangene Zellpopulation wurde als EHnorm-Klon bezeichnet.

2.1.4 Zellzüchtung

Die Züchtung der Zellklone und später der transformierten Zellen in Monalayern erfolgte in 50 mm Falcon - Kulturschalen (Nr. 3030).
Sie wurden auf Traggestelle gestapelt und in Chromatographiekästen mit Schliffdeckel bei 37°C im Wärmeschrank bebrütet.
Die Regulierung des pH Wertes und die Versorgung mit Sauerstoff erfolgte durch Begasung mit einem Luft - CO_2 Gemisch.

Jeder Chromatographiekasten wurde separat mit dem Gasgemisch versorgt. Der CO_2 Gehalt richtete sich nach der jeweiligen Zellkonzentration, da Schalen mit hoher Zellzahl selbst soviel CO_2 bildeten, daß mit einer starren Einstellung des Begasungsgemisches auf 5% CO_2 kein konstanter pH Wert zu erzielen war.

Der CO_2 Gehalt des Luft - CO_2 Gemisches wurde mit Flowmetern der Fa. Fischer und Porter, Göttingen, eingestellt und der eingestellte pH Wert an Hand des im Medium enthaltenen Indikators kontrolliert.

2.1.5 Fixierung und Färbung

Zur Fixierung der Zellen diente eine 10%ige Formalinlösung. Die Einwirkungszeit betrug 10 min. Anschließend wurde 15 min. lang mehrmals mit Wasser gespült. Sollten Kulturen gefärbt werden, wurde Giemsa Lösung (E. Merck, Darmstadt) benutzt, die 1 : 50 mit Aqua bidest. verdünnt war. Färbedauer war 15 min.

2.1.6 Zellzählung

Die automatische Auszählung von Petrischalen wird in einem gesonderten Kapitel besprochen.

Zellsuspensionen wurden mit einer Schillingzählkammer nativ und unverdünnt ausgezählt.

2.2 Transformation und Malignitätstest

2.2.1 Spontane Transformation

Ein Teil der Zellen des EHnorm-Klons wurden regelmäßig subkultiviert. Die Ablösung der Zellen erfolgte mit der STV Lösung, die 0,05% Trypsin (Trypsin kristall. E. Merck, Darmstadt) und 0,024% EDTA-Na enthielt (Marcus et al., 1956).

Nach 7 monatiger Subkultivierung (25 Passagen) induzierten diese Zellen

nach Beimpfung auf Mäuse Tumoren und wurden dann als EH perm bezeichnet.

2.2.2 Transformation mit kanzerogenen Aromaten

Zellen der 5. EHnorm-Subkultur wurden mit dem kanzerogenen Aromat 3-methylcholanthren behandelt.
1 mg 3-methylcholanthren wurde in 1 ml Aceton gelöst und unter starkem Rühren in 100 ml Medium eingebracht. Nach Abblasen des Acetons mit Luft + 5% CO_2 konnte das Gemisch sterilfiltriert werden.
Diese Stammlösung 1 : 10 in Medium verdünnt, ergab das Transformationsmedium (Endkonzentration: 1 µg/ml Medium).
Die EHnorm-Zellen der 5. Subkultur wurden dann eine Woche mit diesem Transformationsmedium behandelt. Anschließend erfolgte die Weiterzüchtung unter Standardbedingungen und Einfrieren nach beschriebener Methode. Dieser Zellklon wurde EHmethyl genannt.

Die Bestimmung des Malignitätsgrades der unterschiedlich behandelten Zellen erfolgte im Mäuseversuch.

2.2.3 Bestimmung der Tumorbildungsrate verschiedener Hamsterzellklone im Mäuseversuch

Als Versuchstiere dienten weibliche NMRI-Mäuse, die in Inzucht im Zentralinstitut für Biochemie und Biophysik der FU gehalten werden.

Es kam dabei darauf an, möglichst junge Tiere einzusetzen, da ihr Immunsystem noch nicht soweit wie bei erwachsenen Tieren ausgebildet ist und Tumoren leichter angehen (Snell, 1953, 1957).

Am 6. Lebenstage wurden die Jungtiere in Gruppen zu je 5 bis 6 Tieren mit Konzentrationen von 2×10^3, 2×10^4, 2×10^5 und 1×10^6 Zellen/ml der Klone EHnorm, EHperm und EHmethyl beimpft (Wallace und Rosen 1959; Klein 1959; Foley et al. 1957, 1962).

Jedes Tier erhielt 0,2 ml der jeweiligen Zellsuspension an der gleichen Stelle unter die Rückenhaut gespritzt. In jeder Gruppe wurde einem Kon-

trolltier nur F 12-Medium appliziert.

Die Mäuse wurden täglich kontrolliert und die Tumorbildungsrate über 6 Monate Beobachtungszeit bestimmt.

EHnorm Zellen und das F 12-Medium induzierten in keinem Falle einen Tumor.

Nach Verimpfung der EHperm-Zellen wuchsen bei Zellkonzentrationen von 1×10^6 Zellen/ml nach 20 Tagen bei allen Tieren Tumoren.

Bei den niedrigeren Konzentrationen bildeten sich erst nach etwa 2 Monaten bei 25% der Tiere Spättumoren. Die mit Methylcholanthren behandelten Zellen erzeugten bei etwa 30 % der Mäuse Tumoren, ohne eine Konzentrationsabhängigkeit zu zeigen (Tabelle 1).

Leider ging diese letzte Zellinie durch Kontamination verloren und konnte deshalb nicht für die weiteren Versuche eingesetzt werden.

Tabelle 1

Tumorbildungsrate verschiedener Hamsterzellklone nach Beimpfung auf 6 Tage alte weibliche NMRI-Mäuse.

Verimpfte Zellkonzentrationen pro Tier:

	1×10^6		2×10^5		2×10^4		2×10^3	
Beobachtungszeit	20 Tage	6 Monate	20 Tage	6 Monate	20 Tage	6 Monate	20 Tage	6 Monate
Zellart:								
EHnorm	0/4 x)	0/4	0/4	0/4	0/5	0/5	0/5	0/5
EHperm	3/3	3/3	0/5	1/5	n.u.	n.u.	0/4	1/4
EH 3-methyl-cholanthren	1/3	1/3	1/4	2/4	0/5	2/5	0/4	1/4
Nullprobe mit F 12-Medium allein	0/1		0/1		0/1		0/1	

x) $\frac{\text{Zahl der Tumortiere}}{\text{Zahl der mit Zellen geimpften Tiere}}$

n.u. = nicht untersucht

Nach 6 Wochen wurde je ein Tier mit einem Tumor seziert. Es zeigten sich Tumoren mit zentraler Nekrose von 10 bis 20 mm Ø.
In allen Fällen traten in den Achsellymphknoten Metastasen auf.

2.3 Markierung und Autoradiographie

2.3.1 Markierung

Zur Markierung der Zellen wurde F 12-Medium ohne Thymidin und Leucin verwendet, dem 0,1 µCi/ml ^{3}H-Thymidin (NEN Chemical) mit einer spezifischen Aktivität von 20 Ci mMol zugesetzt war. Das entsprach einer Thymidinkonzentration von 5×10^{-9} M. (Normalkonzentration von Thymidin im F 12-Medium $3,2 \times 10^{-6}$ M).

Alle verwendeten Thymidinchargen wurden vor Gebrauch chromatographisch auf Reinheit überprüft. Die Inkubation der Zellen erfolgte über drei Tage in diesem Medium, dann wurden die Kulturen dreimal mit thymidinhaltigem Medium ohne Aktivität gespült.
Das eingebaute ^{3}H-Thymidin ließ sich mindestens über 4 Generationen deutlich nachweisen.

2.3.2 Autoradiographie

Nach Lösung der Ilfort K2 Fotoemulsion bei 40°C im Verhältnis 1:1 in Aqua bidest. unter vorsichtigem Rühren wurden etwa 4 ml davon auf eine leere Schale pipettiert und verteilt. Dann erfolgte das Übergießen der Emulsion auf eine Probenschale mit fixierten Zellen. Die Emulsion wurde sofort verteilt und für zwei oder drei weitere Schalen verwendet. Danach konnte man die Schalen umdrehen und die überschüssige Emulsion ablaufen lassen. Durch dieses Verfahren entstand eine optimal gleichmäßige Filmschicht.

Die Exposition der Schalen erfolgte anschließend in lichtdichten Kästen zusammen mit Silikagelbeuteln bei 4°C.

In Abständen wurden Kontrollproben entnommen, um die richtige Expositionszeit zu ermitteln. Sie betrug in der Regel 5 Wochen.
Man erzielte dann eine fast vollständige Schwärzung über dem Zellkern.
Nachdem die Schalen ausreichend exponiert waren, konnte mit Kodak D 19 Fertigentwickler bei 16 - 18°C entwickelt, anschließend fixiert und gewässert werden.

3. Zählapparatur für Zellen in Petrischalen

3.1 Problemstellung

Bei Versuchen mit Zellkulturen in Petrischalen stellen sich der optimalen Auswertung der Zellvermehrung Schwierigkeiten in den Weg. Ein wichtiger Punkt ist die ungleichmäßige Verteilung der Zellen auf der Schale. Da auch durch Schütteln keine völlig gleichmäßige Verteilung zu erreichen ist, muß eine relativ große Fläche ausgezählt werden, um einen repräsentativen Querschnitt der Schale zu erfassen.
Um bei den Zellkinetiken die Ergebnisse mit einer Standardabweichung des Mittelwertes von etwa 10 % zu erhalten, müssen bei einer Gesamtfläche der Schale von 1964 mm^2 32 Felder á 4 mm^2 ausgewertet werden. Das entspricht einem Anteil von 6,5 % an der Gesamtfläche. Bei einer Gesamtzahl von 5×10^4 Zellen benötigt ein geübter Untersucher 25 bis 35 Minuten pro Schale.
Dieser hohe Zeitaufwand führt dazu, daß der Versuchsumfang oft auf Kosten der Absicherung der Ergebnisse gekürzt werden muß. Bei den Versuchen war es notwendig,wenigstens drei Zellzyklen zu beobachten und zumindest am Anfang in kurzen Zeitabständen Meßwerte zu sammeln. Wegen der Gefahr von Schwankungen bei biologischen Versuchen mußten darüber hinaus Doppelproben bestimmt werden. Das bedeutete, daß insgesamt mit etwa 300 Schalen pro Versuch zu rechnen war.

Eine weitere Schwierigkeit lag in der Subjektivität des Auswerters. Besonders bei der schnell eintretenden Ermüdung beim Zählen am Mikroskop besteht immer die Gefahr, daß der Untersuchende seine Vorstellung über die "richtige" Zellzahl in das Zählergebnis einfließen läßt.
Diese Fehlerquellen machten die Suche nach einem Weg zur automatischen Auswertung notwendig. Er sollte möglichst einfach und auch billig sein.

3.2 Prinzip der Zählapparatur

Zur Zellzählung sollte eine geeignete Apparatur die Schalen so bewegen, daß sie spiralförmig in möglichst kurzer Zeit abgefahren werden konnten. Mit Hilfe eines Mikroskops sollten die vorbeilaufenden Zellen vergrößert-

und auf eine lichtempfindliche elektronische Aufnahmeapparatur projeziert werden, die jeden Zelldurchgang registrierte und die Summe der Zellen anzeigte.

3.3 Aufbau und Funktion der Zählapparatur

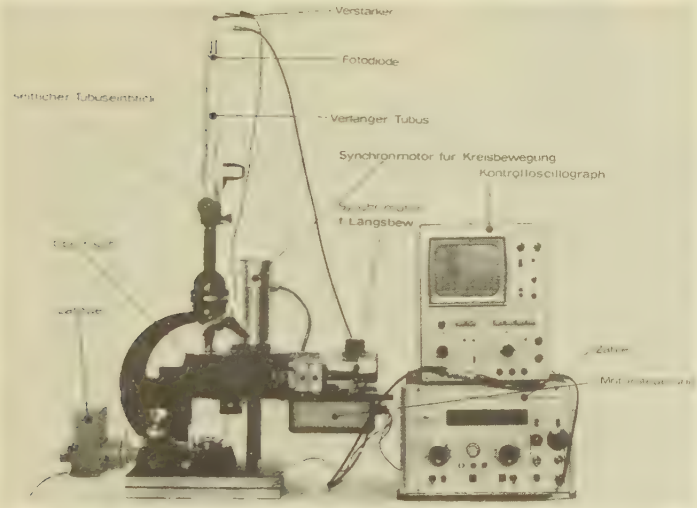

Abbildung 1: Aufbau der Zählapparatur

3.3.1 Konstruktion des Schalendrehtisches

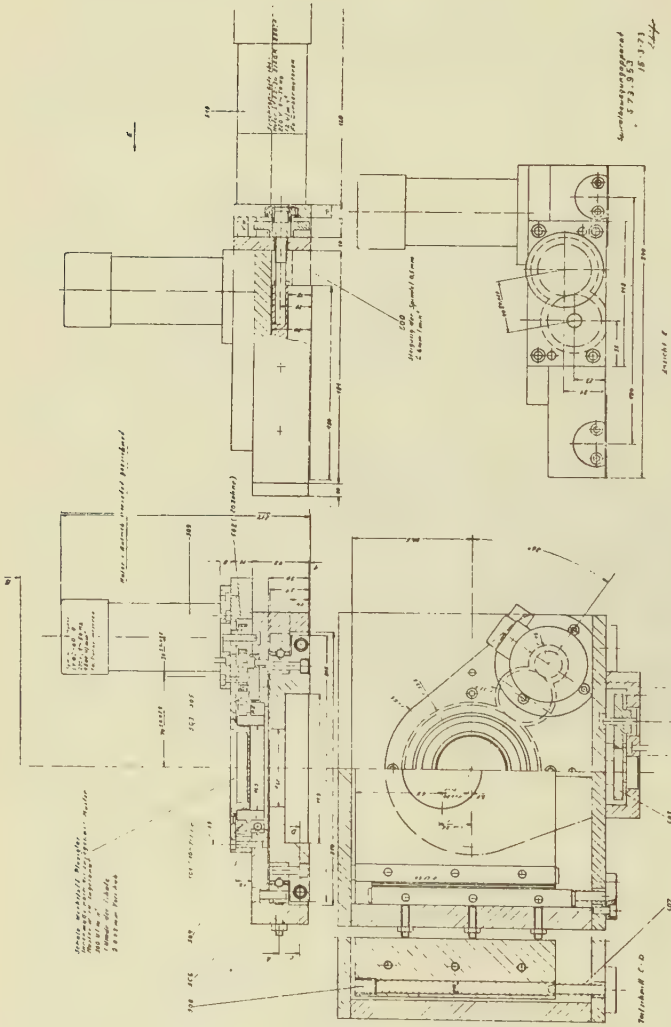

Abbildung 2: Konstruktionszeichnung des Schalendrehtisches

Die Schale wird in eine Plexiglashalterung (1) eingelegt, die in einen auf Kugellagern (504) drehbaren Zahnkranz (501) gespannt ist (Abb. 3). An den Zahnkranz greift ein Synchronmotor (509) an (Fa. Dunker Nr. SY 62-60-4), der die Schale mit 300 U/Min. im Kreise dreht. Alle Teile sind auf einer stabilen,unter der Schale kreisförmig ausgeschnittenen Platte montiert (Abb. 2 und 3). Der Obertisch (Abb. 3 und 4) ist auf einem fest mit dem Mikroskop verbundenen Untertisch in Längsrichtung rollbar montiert (Abb. 4 und 2 Teilschnitt C-D).

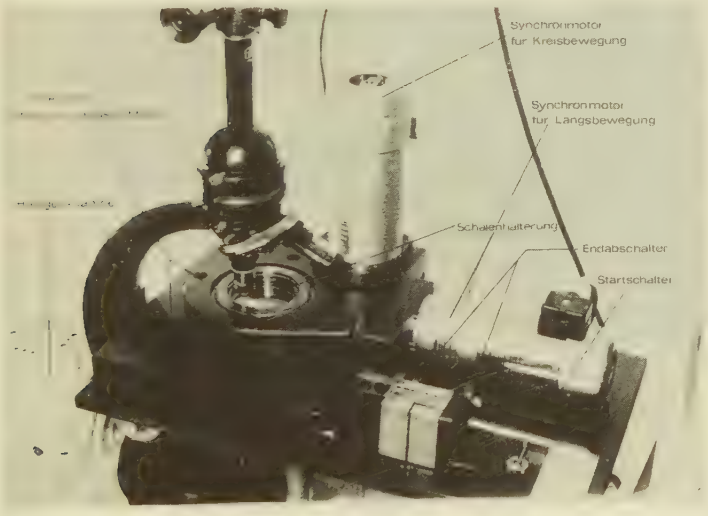

Abbildung 3: Schrägaufsicht auf den Schalendrehtisch

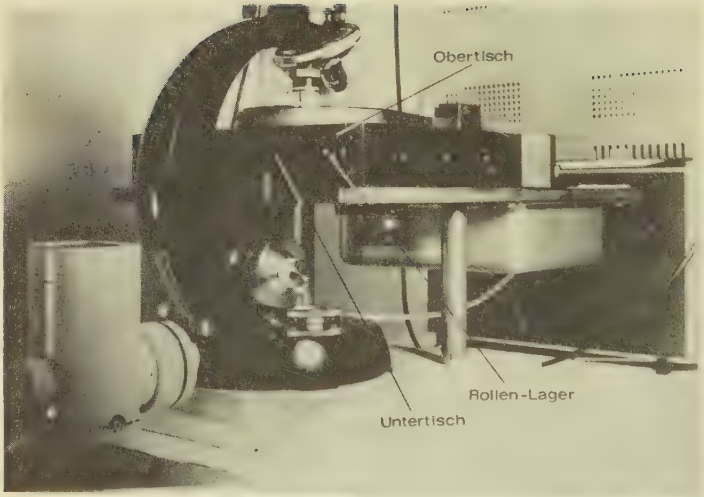

Abbildung 4: Hinteransicht des Schalendrehtisches.

Der Untertisch ist starr mit dem Mikroskop verbunden. Der Obertisch kann auf den Rollenlagern in Längsrichtung hin- und herfahren.

Um geringste Toleranzen der Führung zu ermöglichen, wurden Normführungsschienen mit Wälzlagern verwendet (Fa. Schneeberger, Schweiz, Typ Nr. RG 150).
An diesem Untertisch ist ein zweiter Synchronmotor mit Getriebe 1:250 Untersetzung (Fa. Dunker, Bonndorf, Nr. SY 52-30-2) angebracht (Abb. 2 510), der über eine Mikrometerspindel mit 500 µ Steigung (Abb. 2,500) die obere Platte in Längsrichtung hin und her schiebt. Ein Durchbruch im Untertisch (Abb. 2 Schnitt) ermöglicht in jeder Stellung des Obertisches den Lichtdurchtritt vom Mikroskopkondensor.

Der Schalendrehtisch, der eine geschlossene Einheit darstellt, wurde nun an Stelle des üblichen Kreuztisches an ein vorhandenes Mikroskop (Fa. Zeiss, Oberkochen, Typ Standard WL) angebracht.

Durch die Kreisbewegung der Schalenhalterung und die Längsbewegung des ganzen Obertisches beschreibt das am Untertisch fixierte Objektiv des Mikroskops auf der Schale eine scheinbar konzentrische Spirale. Die Konstanz der Synchronmotoren ermöglicht ohne aufwendige Zahnstangenführung eine präzise spielfreie Kopplung der Rotations- und Längsbewegung.

Die Umdrehungen von Schale und Mikrometerspindel sind so aufeinander abgestimmt, daß sich die Spindel pro Schalenumdrehung um 1/25 ihres Umfanges weiter dreht. Das ergibt bei einer Spindelsteigung von 500 µ einen Vorschub von 20 µ pro Schalenumdrehung. Dieser Vorschub wurde gewählt, da er dem mittleren Zelldurchmesser entspricht, der 18 - 20 µ beträgt. Auf diese Weise war es möglich, jede Zelle zu erfassen.

Die Begrenzung der Längsbewegung wird von zwei Mikroschaltern übernommen (Abb. 3 und 5). Durch diese Schalter wird am Ende jedes Zählvorganges die ganze Anlage abgeschaltet (Abb. 5).

Die Position dieser Mikroschalter auf der Längsachse der Apparatur bestimmt die Größe der vom Objektiv bestrichenen Fläche. Sie wurde so gewählt, daß 40 % der Gesamtfläche ausgewertet werden konnte. Eine größere Ausnutzung der Schalenfläche war nicht möglich, da sonst das Objektiv des Mikroskops mit dem Schalenrand kollidierte.

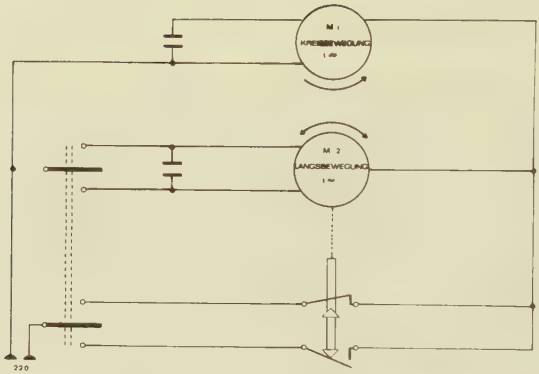

Abbildung 5: Elektrische Verschaltung der Synchronmotoren.

Die beiden Synchronmotoren M_1 und M_2 werden durch den linken Schalter gemeinsam in Gang gesetzt und schalten sich am Ende der Längsbewegung durch Betätigung der Mikroschalter S 1 oder S 2 selbsttätig ab.

Die Berechnung der Fläche und des Flächenfaktors ist aus Abb. 6 zu ersehen.

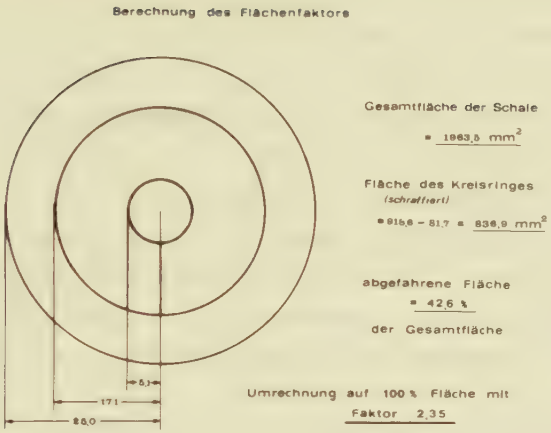

Abbildung 6: Berechnung des Flächenfaktors

3.3.2 Aufnahmeelektronik zur Zellregistrierung.

Bei der Wahl des fotoelektrischen Übertragungssystems ergab sich zunächst folgendes Problem:
Obwohl die Schalen nur mit 300 UpM abgefahren werden, ist die Impulsdauer am Außenrand der Schale sehr kurz. Der Umfang am äußeren Rand beträgt 107,4 mm. Er wird in einer Zeit von 0,2 sec. abgefahren. Bei einem Zelldurchmesser von 20 µ beträgt die Zeitdauer eines Zellimpulses 37 µsec. In Vorversuchen mit Fototransistoren und Fotodarlington, die sehr lichtempfindlich sind, verringerte sich die Impulshöhe deutlich, wenn der Außenrand der Schale abgefahren wurde. Der Grund war wohl darin zu suchen, daß die Impulsdauer am Außenrand der Schale schon im Bereich der Anstiegsträgheit von Fototransistoren lag, die 3-5µsec. beträgt.

Deshalb wurde zur Übertragung der Lichtimpulse die schnelle Silizium-Fotodiode BPX 65 (Fa. Siemens) benutzt, die eine Grenzfrequenz von 50 MHz besitzt. Ein weiterer Vorteil ist ihr planes Glasfenster und die kleine lichtempfindliche Fläche von 1 mm^2.

Silizium-Dioden können zwar sehr hohe Frequenzen übertragen, ein Nachteil ist aber ihre relativ geringe Lichtempfindlichkeit. Dies machte eine Verstärkung der Signale der Fotodiode nötig.

Der Operationsverstärker wurde wegen der kurzen Leitungswege zur Vermeidung von Störeinflüssen direkt hinter der Fotodiode angebracht. Durch die hohe Grenzfrequenz, die übertragen werden mußte, war seine Konstruktion schwierig. Als Herzstück diente der integrierte Operationsverstärker 709 (Fa. Fairchild), der bei 1 MHz Übertragungsfrequenz bis 60 dB verstärken kann.
Das Schaltbild ist in Abb. 7 dargestellt. Zur Anwendung für alle Versuche wurde eine 270 fache Verstärkung gewählt. Sie ließ sich ohne große Schwingneigung der Schaltung realisieren.

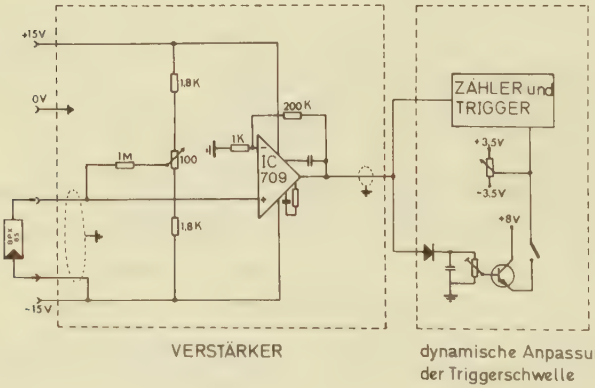

Abbildung 7: Verstärkerschaltung für Silizium-Fotodiode BPX 65 mit 270facher Verstärkung. Grenzfrequenz 1 MHz.

Die Fotodiode BPX 65 lag in Sperrichtung an einem Mega-Ohm Arbeitswiderstand bei 15 V Betriebsspannung. Der Verstärker war als Gleichspannungsverstärker geschaltet und zeigte eine starke Anfangsdrift. Er brauchte wenigstens 20 min. bis zur Stabilisierung. Spannungsschwankungen durch verschiedene äußere Einflüsse konnten beim Zählvorgang durch die dynamische Anpassung der Triggerschwelle ausgeschaltet werden (Abb. 7).

Die Fotodiode war auf ein innen geschwärztes Rohr aufgesetzt und mit dem Mikroskop durch einen Fotoadapter (Fa. Kodak, Stuttgart) verbunden. Zur Scharfeinstellung der Zellen war über dem Adapter ein seitlicher Einblick in den Strahlengang möglich (Abb. 1 und 3).

Da die Siliziumfotodiode auf Schwankungen der Lampenhelligkeit durch die übliche Wechselbetriebsspannung empfindlich reagierte, wurde die 100 Watt Halogen-Mikroskopierlampe (Fa. Zeiss, Oberkochen) von einem selbstgebauten Leistungsgleichrichter betrieben. Zur Spannungsversorgung des Verstärkers diente der Konstanter der Fa. Schroff, Karlsruhe, Typ SB 202.

3.3.3 Beseitigung von Störfaktoren im optischen System.

Die Hitzeentwicklung der Halogenlampe war recht beträchtlich, brachte aber die Polystyrolschalen nicht zum Schmelzen, da die Schwärzung und damit die Wärmeaufnahme unter normalen Versuchsbedingungen gering war.

Völlig geschwärzte Schalen schmolzen innerhalb weniger Sekunden. Zur Sicherheit wurde deshalb in den Meßpausen ein Wärmefilter in den Strahlengang gelegt (Fa. Schott, Mainz).

Das störende Zellplasma und die nicht markierten Zellen in den Kontaktinhibitionsversuchen ließen sich durch Aufbringen von Immersionsöl $n_d = 1,515$ optisch völlig beseitigen. Das Öl griff weder die Autoradiographieemulsion noch die Schalen an.

Die Schatten von Gitternetzen auf den Schalen konnten mit dem Mikroskopkondensor überblendet werden.

Größere Mühe bereitete die bei allen Schalen vorhandene Wölbung des Bodens. Die Tiefenschärfe sowohl des benutzten 25 x Objektivs (Num. App. 0,45) als auch des 10 x Objektivs (Num. App. 0,22) war so gering, daß die markierten Zellen nach einigen Umdrehungen des Tisches unscharf wurden und keinen Dunkeleffekt auf der Fotodiode mehr erzeugten. Dieser Fehler ließ sich durch zwischen Schalenboden und Plexiglashalterung gebrachtes Immersionsöl ausmerzen. Der Boden blieb nach Andrücken der Schale, durch die Kapillarkräfte gehalten, weitgehend eben und im Tiefenschärfebereich des 10 x Objektivs.

3.4 Funktionsprüfung der Apparatur

3.4.1 Einfluß des Abbildungsmaßstabes

Nach diesen Vorarbeiten war zunächst zu klären, wieweit sich die Impulse einer Nullschale (Schale mit Zellen, Emulsion, keine Markierung) von denen einer Schale mit markierten Zellen unterscheiden.

Dazu und zu den folgenden Funktionsuntersuchungen wurde ein Impulshöhen-Vielkanalanalysator (Fa. Telefunken, Typ MS VAS 1105/1) mit maximaler Kanalzahl von 1024 verwendet. Dieses Gerät ermöglicht es, ein Impulsgemisch nach Höhe und Anzahl der Impulse zu trennen. Die Gesamtzahl von 1024 Kanälen wurde in 16 Blöcke mit je 24 Kanälen aufgeteilt. Die maximal mögliche 10 Volt Eingangsspannung verteilte sich so auf die 64 Kanäle, daß jeder Kanal Impulse aufnahm, die um 0,156 Volt höher lagen, als die im vorhergehenden (Eingangskenndaten: 10 V max. 1 KOhm, obere Grenze 10 V, Basis 0,02 V).

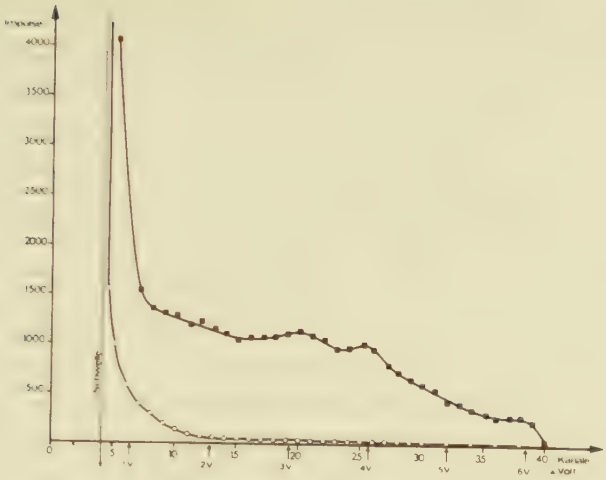

Abbildung 8: Unterschied der Impulsverteilung einer Nullprobe gegen eine markierte Schale.

0 Nullprobe ■ markierte Probe (Dioden Okularabstand 5 cm. Hell-Dunkelspannung 6,5 Volt) 10 x Objektiv 25 x Okular. Der Vergleich der Kurven zeigt, daß die markierten Zellen Impulse liefern, die deutlich außerhalb des Rauschens liegen.

Die in Abb. 8 aufgetragene Impulshöhenverteilung ist nicht von überzeugender Qualität, da ein Peak, der nur markierte Zellen anzeigt und sich einwandfrei für eine Impulszählung abgrenzen ließe, fehlt. Es galt nun zu überlegen,mit welchen Maßnahmen die Impulsqualität verbessert werden könnte.

Wenn eine Schale mit markierten Zellen spiralförmig abgefahren und angenommen wird, daß die lichtempfindliche Fläche genau so groß sei wie die auf sie projezierte Zelle, ist die Wahrscheinlichkeit der Vollbedeckung sowie einer Teilbedeckung der lichtempfindlichen Fläche gleich groß.

Liegt der Vorschub nun im Bereich der Zellgröße, so wird zum Beispiel bei 1/4 Bedeckung im ersten Umlauf beim folgenden Umlauf des Drehtisches 3/4 Bedeckung erreicht. Bei beliebiger Teilbedeckung des ersten Umlaufs addiert sich beim folgenden Umlauf der Rest zur Vollbedeckung. Da der Grad der Bedeckung der Impulshöhe direkt proportional ist, ist ein ganzes Spektrum von Impulshöhen zu erwarten, ohne daß eine besonders herausragt. Bei Verringerung des Vorschubs vergrößert sich nur die Gesamtzahl der Impulse. Auf das Diagramm übertragen, würde man also nur Parallelen zur X-Achse in unterschiedlicher Höhe erhalten.

Bei der Verbesserung der Anlage ging es jedoch darum, der Zellzahl entsprechend viele Impulse in einem möglichst eng begrenzten Höhenbereich zu erhalten, der vom Verstärkerrauschen möglichst weit entfernt lag. Nur in diesem Fall ließ sich ein einfacher Zähler mit Trigger zur Zählung einsetzen. Die Triggerschwelle konnte dann so eingestellt werden, daß nur die Nutzimpulse der markierten Zellen gezählt, das Rauschen aber unterdrückt wurde.

Nach dieser theoretischen Überlegung bot sich zur Lösung des Problems an, die Zelle im Verhältnis zur lichtempfindlichen Fläche stark zu vergrößern. Dadurch würde sich die Wahrscheinlichkeit einer Vollbedeckung mit dem wachsenden Quotienten aus Zellgröße dividiert durch die Fläche der Fotodiode erhöhen.

Bei dem in Abb. 8 dargestellten Versuch betrug das Verhältnis Zelle / Fläche der Fotodiode 1,6 : 1.
Das Ergebnis entsprach also in etwa den theoretischen Erwartungen.

Um einen günstigeren Quotienten zu erreichen, wurde deshalb in der gleichen Versuchsanordnung ein 25 x Objektiv verwendet. Dabei zeigte sich jedoch wie schon vorher, daß die Tiefenschärfe dieses Objektives nicht ausreichte, die Restunebenheiten des Schalenbodens nach der Glättung durch Öl auszugleichen.

Der Vergrößerungseffekt wäre mit einer stärkeren Okularvergrößerung ebenfalls erreicht worden, da es ja auf Abbildung einer Feinstruktur hier nicht ankommt. Leider sind aber Okulare mit Vergrößerungen über 25fach nicht erhältlich.

Es mußte also der Okular - Diodenabstand erhöht werden. Dieser größere Abstand hatte zwar zur Folge, daß sich die Leuchtdichte sehr stark verringerte. Sie konnte aber mit einer 100 Watt Halogenlampe (Zeiss, Oberkochen) angeglichen werden. Bei einem Dioden - Okularabstand von 25 cm konnte das Verhältnis von projezierter Zellfläche zu lichtempfindlicher Fläche auf 8 : 1 verbessert werden. Der Effekt ist in Abb. 9 dargestellt.

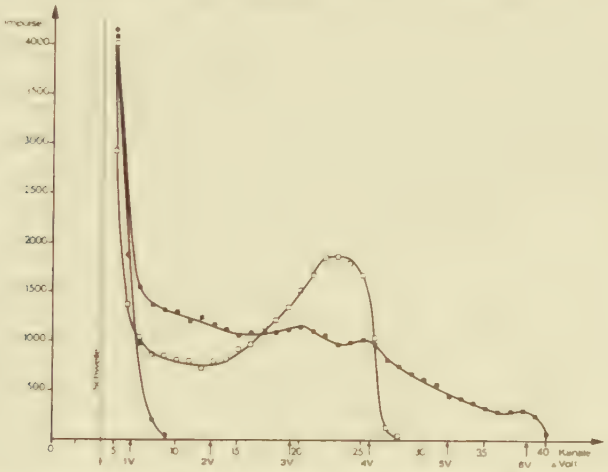

Abbildung 9: Verbesserung des Impulsverteilungsmusters durch Erhöhung des Abbildungsmaßstabes der Zelle auf der Fotodiode auf 8 : 1.

● Nullschale

■ Testschale 10 x Objektiv 25 x Okular 5 cm Dioden - Okularabstand Zelle / Diodenfläche 1, 6 : 1

□ Testschale 10 x Objektiv, 25 x Okular 25 cm Dioden - Okularabstand

Der Versuch aus Abb. 9 bestätigt voll die theoretisch erwartete Häufung einer bestimmten Impulshöhe nach Vergrößerung des Abbildungsverhältnisses der Zelle zur lichtempfindlichen Fläche.

Streulicht in dem 25 cm langen Tubus, welcher das Bild der Zelle auf der Fotodiode überstrahlte, wurde durch Zwischenblenden beseitigt. Die Lage der Blenden hatte keinen Einfluß auf die Impulse.

3.4.2 Einfluß der Scharfeinstellung auf die Nutzimpulse

Nach Darstellung eines abgrenzbaren Nutzimpulsbereichs wurde der Einfluß der Scharfeinstellung des Mikroskops auf diese Impulse quantitativ geprüft. Das Ergebnis ist in Abb. 10 dargestellt.

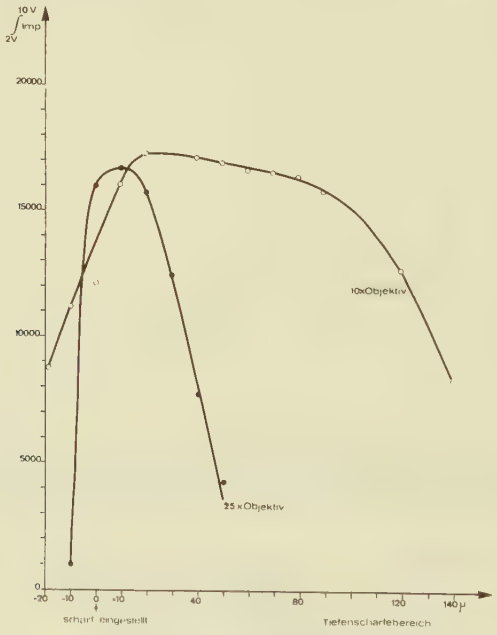

Abbildung 10: Konstanz der Impulssumme in Abhängigkeit von der Tiefenschärfe des Objektivs

In Abb. 10 sind nur die Summen der für die Zählung interessanten Nutzimpulse ab einer Impulshöhe von 2 Volt aufgetragen. Die Kurven zeigen, daß die Tiefenschärfe des 25 x Objektivs nur im Bereich von 10 µ akzeptable Impulssummen zuläßt, während dieser Bereich beim 10 x Objektiv auf 50 µ ausgedehnt ist.

Da die Unebenheiten des Schalenbodens Schärfeschwankungen von 20 - 30 µ aufweisen, ließ sich nur das 10 x Objektiv einsetzen. Bei diesem Objektiv muß für die Messung der Fokus des Mikroskops 50 µ über die Scharfeinstellung gehoben werden, da der verwendete Fototubus (Fa. Kodak) auf die Kamerabrennebene abgestimmt ist, die weit unter der Ebene der Fotodiode liegt.

3.4.3 Optimale Abstimmung der variablen Zählapparatur-Parameter.

Die variablen Parameter Lampenspannung, Vorschub und Triggerschwelle des Zählers, die alle unmittelbar die Impulszahl beeinflußten, mußten nun so optimal aufeinander abgestimmt werden, daß die Apparatur für jede Schale die richtige Zellzahl direkt anzeigte.

3.4.3.1 Lampenspannung

Bei den weiteren Messungen wurde die vorher bestimmte optimale Scharfeinstellung zu Grunde gelegt und nun bei einem Vorschub von 20 µ die Lampenspannung variiert. Die Ergebnisse zeigt Abb. 11.

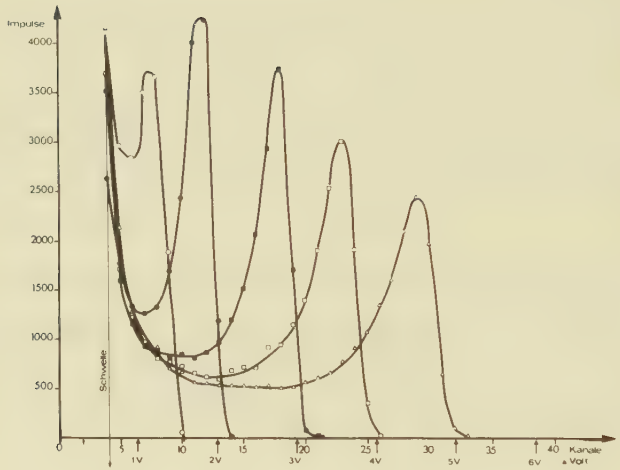

Abbildung 11: Einfluß der Lampenspannung auf die Verteilung der Nutzimpulse

○ 1,5 V Hell-Dunkelspannung	Obj. 10x
● 2 V " "	Tubus 25 cm
■ 3 V " "	Testschale 3,7 x 10^4 Zellen/ Schale
□ 4 V " "	20 µ Vorschub
△ 5 V " "	

Das Diagramm verdeutlicht, daß sich mit zunehmender Hell-Dunkelspannung der Nutzimpulsbereich immer weiter nach rechts vom Rauschbereich entfernt. Ein weiterer Effekt zeigt sich, wenn man für jede Kurve von einer steigenden unteren Schwelle aus die verbleibenden Impulssummen aufträgt (Abb. 12).

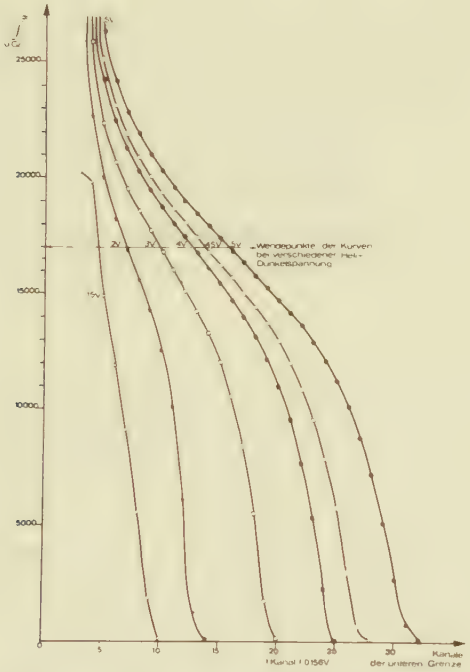

Abbildung 12: Integrale der Kurven aus Abb. 11 in Abhängigkeit der steigenden unteren Grenze.

Testschale $3,7 \times 10^4$ Zellen / Schale 20 µ Vorschub

Im Diagramm 12 läßt sich erkennen, daß die Integrale aller Kurven im 1. Wendepunkt gleich sind. Das bedeutet, daß die Impulssummen unabhän-

gig von der Höhe der Lampenspannung immer gleich sind, solange die Triggerschwelle des Zählers im Minimum der Impulsverteilungskurve liegt. In diesem Bereich gibt es natürlich auch die geringste Impulszahlabweichung bei Schwankungen der Lampenspannung.

Die Steigung der Wendetangente, die ja ein Maß für die Höhe der Impulszahlschwankung in diesem Bereich der Kurve ist, nimmt mit steigender Hell-Dunkelspannung ab.

Aus diesen Ergebnissen läßt sich folgern, daß für die optimale Einstellung der Apparatur die größtmögliche Hell-Dunkelspannung benutzt werden muß. Der limitierende Faktor ist allein die Grenzbelastung der Mikroskopierlampe. Um eine Hell-Dunkelspannung von 5 Volt zu erzeugen, ist die maximale Lampenspannung von 12 Volt notwendig.

Zur Verlängerung der Lampenlebensdauer wurde die 11, 5 Volt Lampenspannung entsprechend 4, 5 Volt Hell-Dunkelspannung als optimale Lampeneinstellung angenommen.

3.4.3.2 Vorschub

Als weiteres Problem war zu untersuchen, welchen Einfluß unterschiedliche Vorschubweiten auf die Nutzimpulse haben.

Für diese Versuche wurde der Synchronmotor der Längsbewegung mit einem Leistungsfrequenzgenerator angesteuert. Auf diese Weise konnte der Betriebswechselstrom zwischen 20 und 90 Hz und damit die Spiralenweite zwischen 8 µ und 36 µ variiert werden.

Als Testpräparate dienten Eichschalen $2,6 \times 10^5$ und $3,7 \times 10^4$ autoradiographierten Zellen / Schale. Das Ergebnis dieses Versuchs ist in Abb. 13 wiedergegeben.

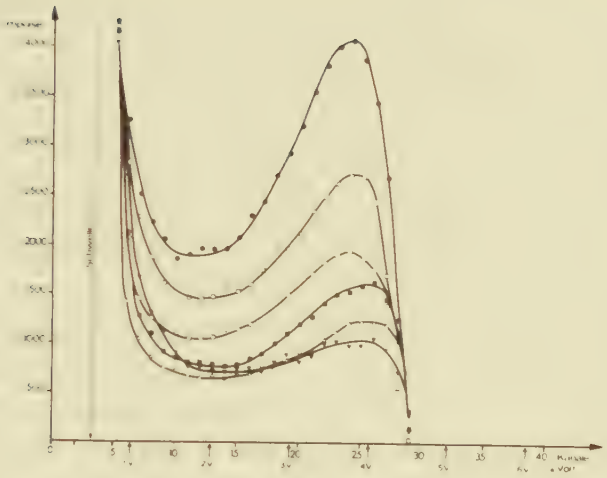

Abbildung 13: Einfluß unterschiedlicher Vorschübe auf die Verteilung der Nutzimpulse

Vorschubgröße: ● 8 µ, □ 12 µ, o 16 µ, ■ 20 µ, △ 24 µ, ▼ 28 und 32 µ

Abbildung 13 zeigt klar, daß Maxima und Minima der Kurven weitestgehend übereinander liegen. Das bedeutet, daß die Größe des Vorschubs keinen Einfluß auf die Häufigkeitsverteilung der Impulse hat.
Dieses Ergebnis bestätigt die theoretischen Überlegungen des Abschnitts 3.4.1. Eine Verringerung des Vorschubs führt allein zu einer Parallelverschiebung der Kurve in y-Richtung.

3.4.3.3 Triggerschwelle des Zählers

Offen bleibt schließlich noch,auf welche Schwellenspannung der Trigger des Zählers gelegt werden soll.

Beim Überschauen der Befunde bietet sich das Minimum der Häufigkeitsverteilungskurve der Impulshöhen an.
Wenn 4,5 Volt Hell-Dunkelspannung erzeugt werden, liegt dieses bei etwa 2 Volt.
Im folgenden sollen unter Zusammenfassung der vorstehenden Befunde die Gründe dafür angeführt werden.

1) Wie aus Diagramm 12hervorgeht, sind bei der 2 V Schwelle die Einflüsse der Lampenhelligkeitsschwankungen am geringsten.

2) Der Einfluß des Störrauschens ist bei 2 Volt praktisch verschwunden (Diagramm 8).

3) Die Schwelle bei 2 Volt würde sich mit unseren theoretischen Überlegungen decken. Da die Fotodiode nicht vernachlässigbar klein gegenüber der projezierten Zelle ist, bekommt man neben den Vollbedeckungen eine relativ große Zahl von Teilbedeckungen. Bei 20 µ Spiralenweite bringt jede Teilbedeckung beim nächsten Schalenumlauf eine weitere Teilbedeckung, die sich beide zu einer Vollbedeckung ergänzen. Das heißt 10 % Bedeckung bringen 90 % Bedeckung, 50 % noch einmal 50 %.
Wenn jedoch die Schwelle auf 50 % der Spannung der Maximalimpulse gebracht wird, werden alle Bedeckungen und damit Impulse kleiner als 50 % der Vollbedeckung abgeschnitten.
Die Maximalimpulse liegen bei 4 Volt, wie Diagramm 13 zeigt. Daraus resultiert eine Schwelle bei 2 Volt.

4) Schließlich lassen sich die Überlegungen im Experiment durch Messen einer Eichschale bestätigen. Aus Abb. 12 ist zu ersehen, daß bei 2 Volt unterer Grenze und 20 µ Vorschub die maschinengezählten Werte mit der Zellzahl der Testschale in etwa übereinstimmen, wenn die ausgewertete Fläche von 42,6 % mit dem Faktor 2,35 (Abb. 6) zugrundegelegt wird.

$3,77 \times 10^4$ Zellen / Schale ergeben 16500 Impulse.
Multipliziert mit Faktor 2,35 = $3,87 \times 10^4$ Partikel.

3.4.4 Dynamische Triggerschwellen-Anpassung

Die Triggerschwelle des Zählers, die auf 50 % der maximalen Impulshöhe eingestellt war, mußte bei schwächer oder stärker markierten Chargen jedesmal wieder neu auf die jeweiligen Maximalimpulse abgeglichen werden. Dichteschwankungen innerhalb einer Charge führten zu Fehlmessungen. Deshalb wurde eine elektronische Schaltung entwickelt, die die Triggerschwelle automatisch auf einen bestimmten Prozentsatz der maximalen Impulshöhe einstellte (Abb. 7).

Die Schaltung besteht im Prinzip aus einem Kondensator, der von den am Zähler eintreffenden Impulsen auf die Höhe der Spannungsspitzen aufgeladen wird. Von einem sehr hohen, parallel geschalteten Widerstand wurde eine bestimmte Teilspannung, in unserem Fall 50 %, abgegriffen. Über einen Verstärkertransistor wurde diese Teilspannung an das Potentiometer des Triggers angelegt und regelte so automatisch die Triggerschwelle im gewünschten Verhältnis zu den Maximalimpulsen ein.

Dadurch konnten auch Helligkeitsschwankungen der Mikroskopierlampe mühelos ausgeglichen werden.

3.4.5 Abschlußtest mit Eichschalen

Durch eine Serie von Eichschalen sollte überprüft werden, ob der Apparat bei den im Versuch verwendeten Zellkonzentrationen richtig zählte.

Dazu wurden 4 x 3 markierte und autoradiographierte Eichschalen in den Bereichen 2×10^3, 2×10^4 und 2×10^5 Zellen / Schale angelegt. Bei der visuellen Auszählung der Schalen lag die Standardabweichung des Mittelwertes bei etwa 12 - 18 %.

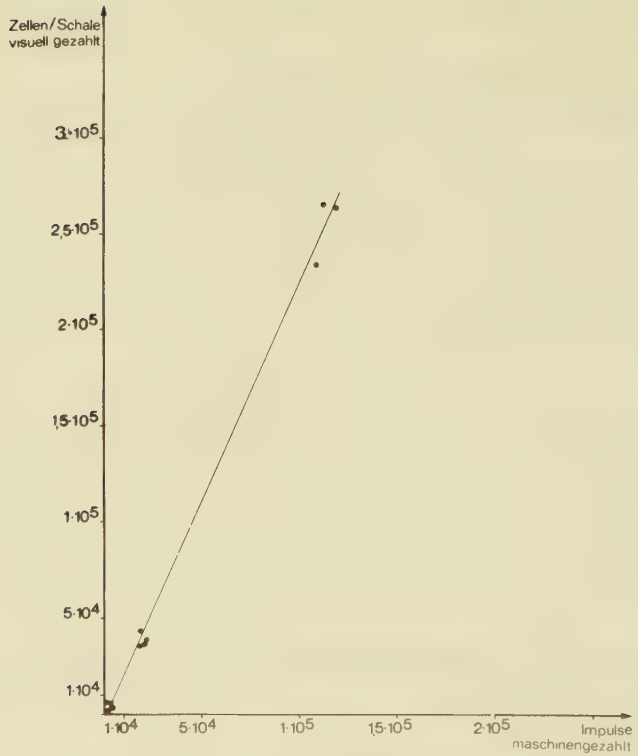

Abbildung 14: Eichung der maschinellen Zählung mit Hilfe von unterschiedlichen Zellkonzentrationen. Die visuell gezählten Werte sind gegen die maschinell gezählten aufgetragen.

Im Diagramm 14 werden die Impulswerte der Zählapparatur mit den visuell erhaltenen Zellzahlen verglichen. Die Abhängigkeit ist linear. Die Gerade besitzt eine Steigung von 0,447. Der Korrelationskoeffizient r ist 0,99.

Die Steigung der Geraden muß, wenn die Zählapparatur richtig zählt, mit dem Verhältnis der bestrichenen Schalenflächen zur Gesamtfläche übereinstimmen. In Abb. 6 wurde dieses Verhältnis mit 0,426 errechnet.

Es liegt innerhalb der halben Standardabweichung der Geradensteigung, die wegen der oben angegebenen Abweichung der visuellen Zählung zwischen 0,418 - 0,446 - 0,476 schwankt. Damit ist mit hinreichender Genauigkeit die Übereinstimmung der Maschinenzählung mit der visuellen Zählung gezeigt.

4. Entwicklung eines Chemostaten

Ein Chemostat, der die in der Diskussion beschriebenen Kriterien erfüllte, sollte der Einfachheit halber möglichst mit vorhandenen Geräten konstruiert werden. Dazu bot sich ein Filtrationsgerät aus Kunststoff der Firma Sartorius, Göttingen, an, das als Fermentergefäß dienen sollte. Am Boden dieses Gefäßes befand sich ein Membranfilter, über dem sich unmittelbar der Rührer drehte. Um die Zellen in Suspension zu halten und den Filter freizuspülen, wurde ein Flügelrührer eingebaut.

Während mit einer Peristaltikpumpe durch den Filter verbrauchtes Medium abgesaugt wurde, sollte über dieselbe Pumpe gleichzeitig in gleicher Menge frisches Medium zugegeben werden. Die Begasung zur pH-Regulierung erfolgte durch Aufblasen einer geeigneten Luft-CO_2 Mischung auf die Oberfläche der Suspension.

Um Volumenverluste durch Verdunstung zu verhindern, wurde ein Rückflußkühler auf dem Gerät angebracht.

Die pH-Messung sollte mit Hilfe einer Durchflußküvette im Mediumauslauf erfolgen. In Abbildung 15 ist eine Konstruktionszeichnung des Chemostaten dargestellt.

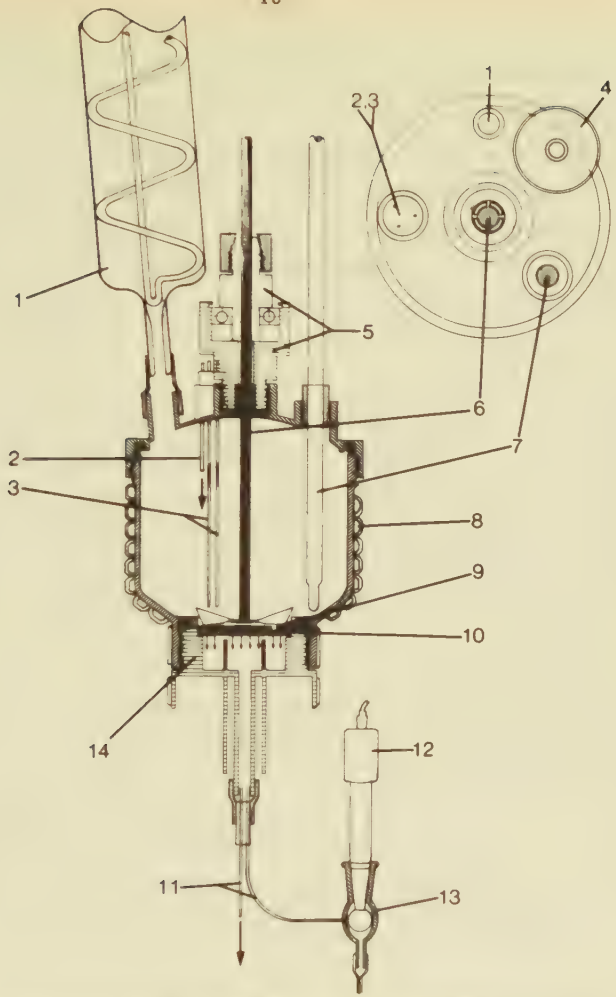

Abbildung 15: Chemostat zur Durchführung von Zellkinetiken

1. Rückflußkühler, 2. Mediumzulauf, 3. Probeentnahme und Zellentnahme für Cytostatenbetrieb, 4. Gaseinlaßfilter, 5. Gasdichte Rührerführung, 6. Rührer 4-flüglig V_2A Stahl, 7. Thermometer, silikonisiert, 8. Temperiermantel aus Wärmeschläuchen, 9. Membranfilter 8 µ Porenweite, 10. Auflageplatte für Membranfilter, 11. Ablauf des zellfreien Mediums zur Pumpe, 12. Glaselektrode im Auslauf, 13. Durchflußküvette, 14. Einschraubbarer Bodenverschluß des Kulturgefäßes mit Filter.

4.1 Kulturgefäß

4.1.1 Gefäß

Als Kulturgefäß kam ein Filtrationsgefäß aus Makrolon der Fa. Sartorius Typ SM 165 mit 250 ml Inhalt zur Anwendung. Es konnte im Autoklaven bis 120°C erhitzt werden (Abb. 15).
Am Gefäß selbst wurde der Deckel geändert, da die Einlässe für unsere Zwecke zu klein waren.
Lediglich ein Originalsteckanschluß zum Aufstecken des Gasfilters wurde belassen (Abb. 15, 4).
Zusätzlich wurden zwei 15 mm Ø / Stutzen für Zulauf-Entnahme und Thermometer und ein 8 mm Ø Stutzen zum Anschluß eines Rückflußkühlers aufgeklebt (Abb. 15, 1, 2, 3, 7).
In den mittleren Originalschraubstutzen wurden eine gasdichte Rührerführung aus V_2A-Stahl eingebaut (Abb. 15, 5).
Für das Aufkleben war folgende Technik angewandt worden, um Blaseneinschlüsse zu vermeiden:
Dünne Makrolonspäne wurden so in Methylenchlorid gelöst, daß eine sehr dicke, zähe Masse entstand. Die aufzuklebenden Teile wurden satt mit der Masse bestrichen und angedrückt. Anschließend kamen die Teile in den Kühlschrank bei 4°C für 2 Tage.
Dadurch wurde das Verdunsten des Lösungsmittels soweit verlangsamt, daß keine Blasen entstanden. Anschließend erfolgte eine Nachtrocknung bei Raumtemperatur für 3 Tage. Erst dann konnten die Gefäße erhitzt werden, ohne starke Blasenbildung zu erzeugen.

4.1.2 Temperieren

Da das Kulturgefäß einwandig war, wurde es außen mit halbrunden Spezialschläuchen der Fa. Calorex umwickelt, durch die temperiertes Wasser vom Thermostaten geleitet wurde (Abb. 15, 8). Die Wärmeschläuche wurden mit autoklavenfestem Spezialklebeband der Fa. Beiersdorf, Tesa Nr. 657, am Kulturgefäß befestigt.

Zur Isolierung des Gefäßes und zum Schutz der Zellen gegen die UV-Strahlung im Sterilraum wurden die Kulturgefäße in Alufolie eingepackt.

4.1.3 Verschlüsse

Alle Zu- und Ablauföffnungen der Kultur waren mit Silikonstopfen verschlossen, durch die V_2A Stahlkanülen liefen.
Auf diese Kanülen wurden dann die Zu- und Ablaufschläuche geschoben.

4.1.4 Filter

Am Boden des Gefäßes war auf einer perforierten Platte mit einem Silikondichtring das Filter eingespannt. Es wurde ein Cellulosefilter mit 8 µ Porenweite (Fa. Sartorius) verwendet. Die 8 µ Porenweite war deshalb entscheidend wichtig, weil zwar Zellen (bei mittlerem Zelldurchmesser von 20 µ) zurückgehalten, Detritus aber durchgelassen wurde. Dadurch konnte ein vorzeitiges Zusetzen des Filters verhindert werden.

4.1.5 Rührer

Die Suspension wurde durch einen vierflügligen V_2A Stahlrührer mit einer Umdrehungsgeschwindigkeit von 100 U/Min. aufrechterhalten (Telling und Elswarth, 1965).
Die Flügel waren auf Saugen angestellt und befanden sich unmittelbar über dem Filter. Dadurch wurde der Freispülungseffekt am Filter unterstützt. Der Rührer wurde mit einem üblichen Laborrührmotor (Fa. Jahnke und Kunkel, Staufen) angetrieben. Zum Betrieb mehrerer Kulturgefäße nebeneinander benutzten wir einen Reihenantrieb eigener Konstruktion.

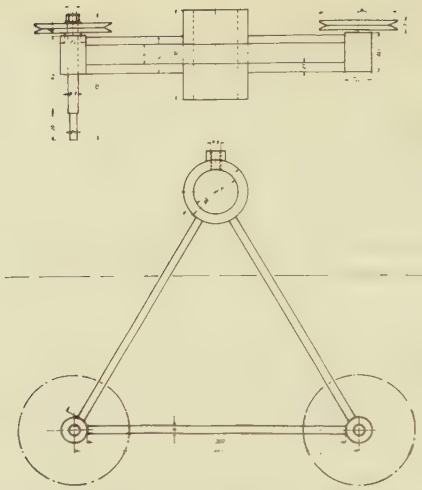

Abbildung 16: Reihenantrieb für zwei Rührer nebeneinander

4.1.6 Rückflußkühler

Die kontinuierliche Begasung brachte auf die Dauer erhebliche Flüssigkeitsverluste durch Verdunsten aus der Kultur mit sich. Es war daher unerläßlich, alles aus der Kultur entweichende Gas über einen Rückflußkühler laufen zu lassen.

Wir benutzten einen Schlangenkühler von 50 cm Länge, der von einem Kühlaggregat auf etwa 0°C gehalten wurde (Fa. Haake, Berlin). Auf diese Weise ließ sich das Verdunstungswasser quantitativ zurückgewinnen.

4.2 Begasung und pH-Kontrolle

Telling und Elsworth zeigten (1965), daß die KCl-Menge, die aus Glaselektroden diffundiert, in Kleinfermentern nicht vernachlässigbar ist. Erst ab 4 l Fermentervolumen fallen sie nicht mehr ins Gewicht.
Deshalb wurde die Glaselektrode mit einem Durchflußgefäß in den Medium-

auslauf der Kultur gelegt.

Das bot außerdem den Vorteil, die Elektrode im Verlauf des Versuchs nachzueichen, ohne die Sterilität der Kultur zu gefährden. Begast wurde mit einem CO_2-Luftgemisch über ein Milliporefilter Swinnex 250, 22 µ Porenweite, das direkt auf dem Gefäßdeckel eingesteckt wurde.

Da unser F 12-Medium auf Bikarbonatbasis gepuffert war, wurde der pH Wert durch die CO_2 Konzentration der Gasphase eingestellt. Es war schon seit längerer Zeit bekannt (Giffort et al., 1956; Telling und Stone, 1964; Björklund et al., 1961), daß ein konstanter Gehalt von 5 % CO_2 im Begasungsgemisch einer Zellkultur nicht ausreicht, über die gesamte Wachstumsphase einen konstanten pH Wert zu garantieren.

Bei hoher Zellkonzentration wird in der Kultur soviel eigenes CO_2 produziert, daß der pH von normalerweise 7,3 bis auf 6,8 absinkt. Deshalb wurden von verschiedenen Autoren CO_2 Durchflußregler in die Kultursysteme eingebaut, die je nach pH Wert die richtige CO_2 Konzentration einstellten (Callow und Pirt, 1956; Vestergaard-Bogind, 1962; Moore und Ulrich, 1965).

Ich selbst verwendete Flowmeter mit Differenzdruckregler (Fa. Fischer und Porter, Göttingen) und mischte je nach pH Wert in der Kultur Luft mit einem Fertiggasgemisch von Luft + 5% CO_2 (Fa. Linde). Bei hohen Zellkonzentrationen über 1 x 10^6 Zellen / ml reichte die Begasung mit Luft allein aus, um den pH Wert bei 7,3 zu halten. Dabei wurde die Durchflußmenge so reguliert, daß in der Kultur zuviel entstandenes CO_2 bis auf 5 % abgeraucht wurde.

4.3 Mediumwechsel

Mit einem Schlauchsatz von zwei Schläuchen wurde mit einer Peristaltikpumpe (Fa. Desaga, Göttingen) gleichzeitig aus einem graduierten Vorratsbehälter frisches Medium in die Kultur gepumpt und unten aus dem Ablaufstutzen abgesaugt. Dadurch waren gleiche Zu- und Ablaufvolumina gewährleistet. Ein- und Auslauf wurden bilanziert, um eventuelle Störungen rechtzeitig zu erkennen.

In bestimmten Abständen wurde das auslaufende Medium auf Zellen kontrolliert, um eine Beschädigung des Filters zu erkennen.
Das Durchflußvolumen zur Mediumerneuerung betrug in der Anfangsphase des logarithmischen Wachstums 70 ml / 24 h und wurde gegen Ende des log-Wachstums bei Konzentrationen von 2×10^6 Zellen / ml auf 130 ml / 24 h gesteigert.
Diese Werte wurden auf folgende Weise ermittelt:
Beim Chemostaten wirken zwei Einflüsse gegeneinander. Einmal der proportional zur Zellzahl ansteigende Verbrauch von Nährstoffen und auf der anderen Seite der Ersatz des Nährstoffes durch Zufluß von frischem Medium.

Der Verbrauch folgt der Gleichung: $\frac{dc}{dt} = - \alpha \times N$

Der Zufluß folgt der Gleichung : $\frac{dc}{dt} = + \frac{F}{V_o} \times (c_{max} - c_{ist})$

Dabei bedeutet:

α = spezifischer Verbrauch $\frac{\text{Mol}}{\text{Zeit x Zelle}}$

N = Zellzahl in der Kultur

F = Durchfluß von Medium in $\frac{\text{Volumen}}{\text{Zeit}}$

V_o = Kulturvolumen 250 ml

c_{max} = Substratkonzentration in frischem Medium oder Substratmenge in 250 ml

c_{ist} = Substratmenge in 250 ml während des Betriebes der Kultur.

Wenn man nun fordert, daß die Nährstoffverarmung durch die Zellen durch Zufuhr von frischem Medium ausgeglichen werden soll, ergibt sich folgende Gleichung:

$$\alpha \times N = \frac{F}{V_o} (c_{max} - c_{ist})$$

c_{ist} nehmen wir für den Fall der vollständigen Nährstoffausnutzung als Null an.

Das Durchflußvorlumen in der Zeit errechnet sich dann nach

$$F = \frac{V_o \times \alpha \times N}{c_{max}}$$

Als Substrat dient die Glucose als allgemeiner Energielieferant.

V_o beträgt 250 ml Kulturvolumen

N kann man mit 2 x 10^6 Zellen / ml ansetzen als höchste zu erreichende Zellzahl mit relativ ungestörtem Wachstum. In 250 ml also 5 x 10^8 Zellen

c_{max} beträgt in unserem F 12 Medium 450 mg Glucose in 250 ml

der spezifische Verbrauch der Zellen läßt sich dann folgendermaßen berechnen:

Zu 100 µg synthetisiertem Protein verbrauchen Asciteszellen maximal 1,5 mg Glucose (Bryant et al., 1958)

10^6 Zellen wiegen 300 µg, d.h. $\frac{10}{3}$ x 10^5 Zellen wiegen 100 µg und verdoppeln dieses Gewicht in 26 h.

Wenn der Proteinanteil der Zelle 10 % ihres Gewichts ausmacht, braucht man also $\frac{10}{3}$ x 10^6 Zellen, um 100 µg Protein zu synthetisieren und damit 1,5 mg Glucose zu verbrauchen.

3,33 x 10^6 Zellen verbrauchen also in 26 h 1,5 mg Glucose.

Eine Zelle verbraucht dann pro Stunde $= \frac{1,5}{3,33 \times 10^6 \times 26} = 1,75 \times 10^{-8}$ mg Glucose

Die gesamte Suspension (250 ml 2 x 10^6 Z / ml) verbraucht also 8,75 mg Glucose / Std.

Da 250 ml frisches Medium 450 mg Glucose enthält, würde dieser Vorrat ohne Neuzufuhr für 52,9 Stunden ausreichen.

Als Minimaldurchfluß zur Versorgung von 2 x 10^6 Zellen / ml und 250 ml Kulturvolumen wären also notwendig

$$F = \frac{250 \text{ ml} \times 1,75 \times 10^{-8} \text{ mg} \times 5 \times 10^8 \text{ Zellen}}{\text{Std} \times \text{Zelle} \times 450 \text{ mg}} = 4,86 \text{ ml / h}$$

oder 116,7 ml pro Tag.

4.4 Probenentnahme

Zur Probenentnahme führten zwei 0, 8 mm Teflonschläuche in die Kultur. Über den einen konnte mit einer Spritze eine beliebig große Zellmenge abgenommen werden.
Außerdem konnte man über diesen Anschluß den gesamten Kulturinhalt in ein neues Gefäß umpumpen, falls der Filter verstopft sein sollte. Dabei wird die Vitalität der Zellen in der Pumpe offensichtlich nicht beeinträchtigt, da sie im neuen Kulturgefäß ungestört weiterwuchsen.

Der zweite Entnahmeschlauch war über eine separate Pumpe mit Zeitschalter an einen Fraktionssammler angeschlossen, mit dem zur Aufnahme einer Kinetik in festgelegten Zeitintervallen eine Probe entnommen wurde.

Lief eine Zellkinetik, wurde Ein- und Ausfuhr kontrolliert, um eventuelle Schlauchdefekte frühzeitig zu erkennen.
Der wahre Mediumstand konnte außerdem laufend durch das durchsichtige Gefäß hindurch überprüft und mit den Kontrollen verglichen werden.
Abbildung 17 und 18 zeigen Wachstumskinetiken, die mit diesem Chemostaten erreicht werden konnten.

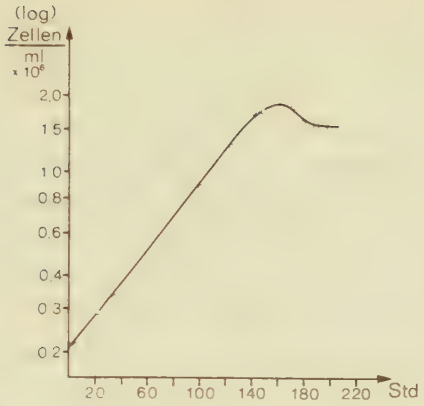

Abbildung 17: Wachstumskinetik von ungeklonten Embryonalen Hamsterzellen (5. Passage) bei kontinuierlichem zellfreien Mediumwechsel

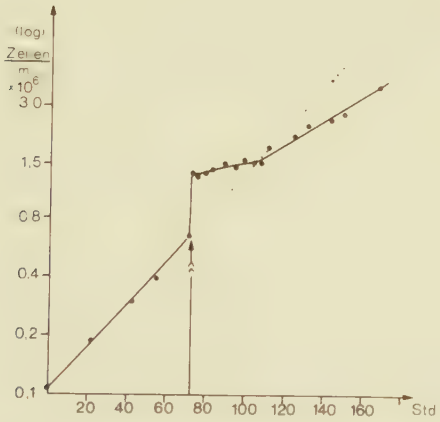

Abbildung 18: Wachstumskinetik von EHperm Zellen. Nach 76 Stunden wurde die Zellkonzentration durch zellfreies Mediumabsaugen innerhalb von 15 Minuten verdoppelt.

5. Zeitlicher Verlauf der Kontaktinhibition.

5.1. Vorversuche

5.1.1 Einsaattechnik von Zellen

Zur Bestimmung der Wachstumskinetik bei markierten Zellen diente folgendes Verfahren: Zu Beginn des Versuchs wurde eine große Anzahl von Kulturschalen mit gleicher Zahl ^{3}H-Thymidin markierter Zellen angezüchtet und unter gleichen Bedingungen bei 37^{o}C bebrütet. In bestimmten Zeitabständen wurden dann Schalen aus dem Versuch entnommen, fixiert, autoradiographiert und die Zellkonzentration bestimmt.

Dazu waren zwei Vorbedingungen nötig. Einmal mußte die Zelleinsaatmenge in jeder Schale gleich sein. Zum anderen war es wichtig, eine möglichst gleichmäßige Verteilung der Zellen über die Schale zu erreichen, da später bei der Auswertung nicht die ganze Schale ausgezählt werden konnte. Wie Vorversuche gezeigt hatten, traten bei Einpipettieren und Umschütteln von Hand Fehler von 30 - 40 % auf. Dagegen ließ sich eine gleiche Verteilung der Zellen mit einem Schüttelapparat erreichen, der ein gleichmäßiges Umschwenken der Schalen gewährleistete.

Dazu wurden Hamsterzellen der kontinuierlich gehaltenen Zellinie EHperm abtrypsiniert, in F 12-Medium aufgenommen und gezählt. Dann wurden 4 verschiedene Verdünnungen hergestellt, so daß nach Ergänzung von 1, 2, 3 und 4 ml Zellsuspension mit F 12-Medium auf insgesamt 4 ml die Konzentration 5 x 10^{4} Zellen / ml betrug.

Im Versuch wurden 0, 1, 2 und 3 ml F 12-Medium in je 5 Falconschalen vorgegeben und anschließend mit der entsprechend verdünnten Zellsuspension auf 4 ml aufgefüllt. Diese Schalen wurden nun teils mit der Hand, teils mit dem Schüttelapparat (Amplitude 3, 5 cm, 60 U/min, Zeit 5 min.) umgeschwenkt. Nach dreitägiger Bebrütung wurden die Schalen jeweils an 10 Stellen (1/4000stel der Schalenfläche) ausgezählt.
Das Ergebnis ist in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2

Vorgabe + Zell-Medium Susp. in ml	Maschinenschüttelung Standardabweichung des MW Schale Nr. 1	2	3	4	Handschüttelung Standardabw. d. MW 5
1 + 3	15,0%	8,4 %	2,1%	11,6%	12,4 %
2 + 2	8,1%	8,4%	10,1%	10,1%	11,0%
3 + 1	8,6%	9,5%	9,4%	6,6%	20,4%
0 + 4 nur Zellsuspension	25,6%	19,7%	46,6%	22,1%	11,6%

Die Ergebnisse der Tab. 2 zeigen, daß die Vorgabe von Medium auf die Schalen die entscheidende Voraussetzung für eine gleichmäßige Verteilung der Zellen war. Die Vorgabe von 2 oder 3 ml Medium und Schwenken mit der Maschine brachte eine Genauigkeit der Ergebnisse von unter 10 % Standardabweichung des Mittelwertes. Die mit Maschinenschütteln erzielten Ergebnisse waren teilweise besser als durch Handschütteln. Fraglich ist, ob es sich statistisch absichern läßt.

5.1.2 Kontrolle der Stationärphase

Für den eigentlichen Versuchsablauf war die Prüfung, ob die Zellen auf den Kulturschalen überhaupt eine Stationärphase erreichten, wichtig. Theoretisch bestand die Möglichkeit, daß sich die Zellen dauernd weiter teilten, nur bei Konfluenz des Zellrasens nicht mehr in der Lage waren,sich festzusetzen. Die Tochterzellen würden stattdessen in das überstehende Medium abschwimmen, welches beim Mediumwechsel verworfen wird. Dadurch könnte der Eindruck einer Stationärphase entstehen.

Um diese Frage zu klären und Fehlinterpretationen zu vermeiden, wurde folgender Vorversuch durchgeführt:

Hamsterzellkulturen von EHperm wurden abtrypsiniert, in frischem F 12-Medium auf 1 x 10^4 Zellen / ml eingestellt, in jeweils 4 ml Portionen in Falconschalen (50 mm Ø) eingesät (Dichte 2 x 10^3 Zellen / cm^2) und unter Standardbedingungen bebrütet.

12 Tage lang wurden täglich 2 Schalen untersucht. Das überstehende Medium wurde steril entnommen, die Zellen auf den Schalen fixiert, gefärbt und ausgezählt. 1 ml des sterilen Überstands diente zur Zählung in der Zählkammer. Die restlichen 3 ml wurden 15 Minuten bei 100 g zentrifugiert und das Zellsediment in frischem F 12-Medium aufgenommen.

Um die Proben später miteinander vergleichen zu können, wurden die Zellen des Sediments auf gleiche Konzentrationen von 3 x 10^3 Zellen / ml eingestellt, je 4 ml auf neue Schalen eingesät (Dichte 6 x 10^2 Zellen / cm^2) und unter Standardbedingungen 5 Tage lang ohne Mediumwechsel bebrütet. Nach Fixierung und Färbung wurden die Schalen ausgezählt.

Die Anwachsrate konnte aus der nach 5 Tagen Inkubation erhaltenen Zellzahl dividiert durch die zu erwartende Zellzahl errechnet werden, wenn man bei einer lag-Phase von 10 Stunden und 34 Stunden Generationszeit in 5 Tagen 3,3 Generationen zu Grunde legt (Abb. 19).

$$Z_t = Z_0 \cdot e^{\lambda \cdot t}$$

Z_t = Soll Zellzahl

Z_0 = Einsaatkonzentration

$$\lambda = \frac{\ln 2}{\text{Generationszeit}}$$

$$\text{Anwachsrate in \%} = \frac{\text{ist- Zellzahl x 100}}{\text{soll- Zellzahl-}}$$

Das Ergebnis des Versuchs ist in Abb. 19 zusammengefaßt.

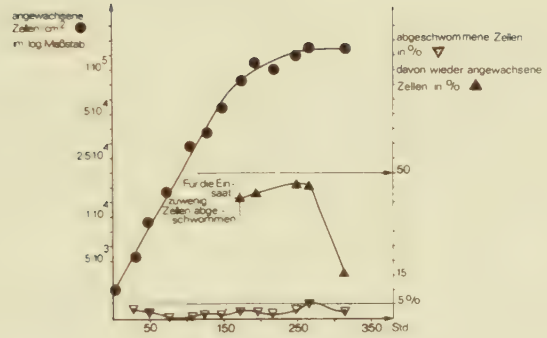

Abbildung 19: Anteil der abgeschwommenen Zellen und deren Anwachsrate im Verlauf einer Wachstumskinetik

Die Zahl aller abgeschwommenen Zellen liegt auch in der Stationärphase unter 5 % der angewachsenen Zellen. Die Anwachsrate der abgeschwommenen Zellen konnte in den ersten 6 Tagen des Versuchs nicht bestimmt werden, weil zu wenig Zellen für eine Wiedereinsaat abgeschwommen waren. Danach lag sie zwischen 41 - 50 %. Erst in der Stationärphase fiel sie auf 16 % ab.

Die Befürchtung, daß eine echte Stationärphase gar nicht eintritt, konnte durch diesen Versuch also ausgeschlossen werden.

5.2 Hauptversuch

5.2.1 Kontaktinhibition

Zur Verfolgung des zeitlichen Verlaufs der Kontaktinhibition sollten das Wachstum von ^{3}H - thymidinmarkierten Zellen des EHperm und des EHnorm-Klons mit Hilfe von EHperm Zellen schlagartig gehemmt werden.

Dazu wurden die EHperm und EHnorm Zellen in separaten chemostatischen Suspensionskulturen in die log-Wachstumsphase gebracht. Diese Zellen waren nicht mit Proteasen in Berührung gekommen und dienten im weiteren Verlauf als Versuchsmaterial.

Die jeweils zu untersuchende Zellsorte wurde der Suspensionskultur entnommen und in 290 Falconschalen (50 mm Ø) eingesät, so daß pro Kulturschale die Endkonzentration der Zellen 2×10^4 Zellen / Schale = 1×10^3 Zellen / cm^2 betrug. Das dabei verwendete F 12-Medium enthielt 0,1 µCi/ml ^{3}H-Thymidin (entsprechend 10^{-9} Molar).

Während die Zellen über 3 Tage unter Standardkulturbedingungen das markierte Thymidin einbauten, wurden in dieser Zeit alle 12 Stunden 2 Schalen als Vorlaufnullprobe aus dem Ansatz entnommen und fixiert. Nach dieser Vorlaufmarkierungsphase wurden die Zellen auf allen Schalen dreimal mit "kaltem" thymidinhaltigem F 12-Medium bei 37°C gewaschen.
Dann wurden die Schalen in 5 Gruppen zu 52 Schalen aufgeteilt.

Die 1. Gruppe erhielt frisches F 12-Medium und diente als Nullprobe.
Die 2. Gruppe erhielt gebrauchtes (conditioned) Medium aus einer stationären Suspensionskultur von EHperm Zellen ($2,5 \times 10^6$ Zellen / ml), bei dem die Zellen durch Zentrifugation entfernt worden waren. Sie diente als Kontrollgruppe.
Die 3. bis 5. Gruppe erhielt 5×10^5, 1×10^6 und 3×10^6 Zellen / Schale (entsprechend $2,5 \times 10^4$ Zellen / cm^2, 5×10^4 Zellen / cm^2 und $1,5 \times 10^5$ Zellen / cm^2) EHperm Zellen aus einer Suspensionskultur, in frischem Medium suspendiert. Dies waren die eigentlichen Kontaktinhibitionsproben.

Alle Schalen wurden bei 37°C inkubiert und so begast, daß der pH Wert über die ganze Versuchsdauer bei 7,3 konstant blieb.
Von jeder Gruppe wurde in den ersten 24 Stunden 2-stündlich, in den folgenden 24 Stunden alle 4 Stunden und dann 48 Stunden lang alle 12 Stunden je eine Doppelprobe entnommen.

Vom Überstand jeder Schale wurden 0,5 ml in 6,5 ml Dioxan POPOP überführt und die Radioaktivität im Scintillationszähler (Packart 3380) gemessen. Die restlichen 3,5 ml des Überstandes wurden mit 1 ml 40%igem Formalin versetzt, geschüttelt und in der Zentrifuge bei 200 g 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und das Zentrifugat zweimal mit Aqua bidest. gewaschen, dann mit Äthanol aufgenommen, auf Falconschalendeckel überspült und staubfrei getrocknet.

Die Kulturschalen der Gruppen 3 bis 5 und die Deckel mit den Zentrifugaten wurden autoradiographiert.
Die Schalen der Gruppe 1 und 2 wurden in den ersten Versuchen mit Giemsa gefärbt und ausgezählt. Nach Entwicklung der Zählapparatur wurden auch diese Proben zur maschinellen Auswertung autoradiographiert.

Das Ergebnis der Versuche ist in den Abbildungen 21, 22 und 23 zusammengefaßt.

Abbildung 20: Kinetik der Wachstumshemmung von EHperm Zellen aus der log-Phase heraus

nach Zugabe von $2,5 \times 10^4$ Zellen/cm^2 ●

im Vergleich zum Wachstum

nach Zugabe von frischem Medium △

und gebrauchtem Medium ○

In Abb. 21 sind Nullprobe, gebrauchtes Medium und die Hemmzellkonzentration $2,5 \times 10^4$ Zellen / cm^2 aufgetragen.

Die Nullprobe zeigt ein ungestörtes exponentielles Wachstum. Auch sieht man, daß das gebrauchte Medium keinerlei hemmenden Einfluß auf das exponentielle Wachstum der Zelle hat. Im Vergleich zur Nullprobe

wachsen die Zellen sogar etwas schneller.

Im Gegensatz zu diesen Kurven verdoppelt sich die Kontaktinhibitionsprobe nach Zugabe der Hemmzellen ohne Verlangsamung in etwa 22 Stunden. Dann stoppt das Wachstum plötzlich und in den folgenden 24 Stunden fallen die Zellen auf ihre Ausgangskonzentration zurück, die sie zur Zeit der Hemmzellzugabe hatten.

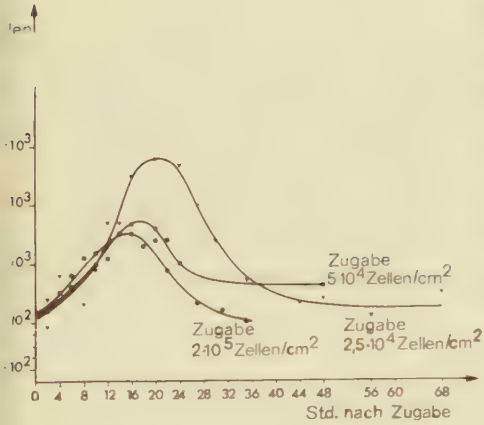

Abbildung 21: Kinetik der markierten EHperm Zellen nach Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen von EHperm Zellen

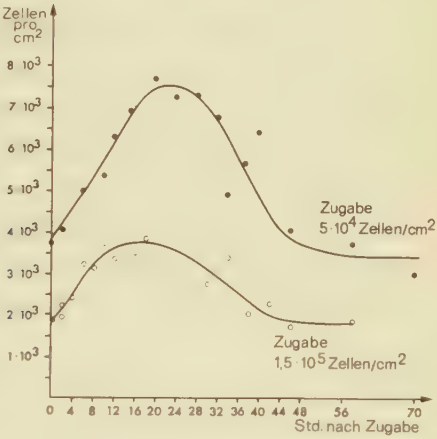

Abbildung 22: Kinetik der markierten EHnorm Zellen nach Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen EHperm Zellen

Abb. 21 und 22 zeigen mehrere einzelne Versuche mit unterschiedlichen Hemmzellkonzentrationen und zwei unterschiedlichen Zellsorten. Die einzelnen Meßpunkte sind aus Doppelproben ermittelt. Die Nullproben verlaufen wie in Abb. 20.

Bei beiden Zellsorten und allen eingesetzten Hemmzellkonzentrationen erscheint der gleiche Wachstumsverlauf. Nach Zugabe der Hemmzellen verdoppeln sich die markierten Zellen ohne Verlangsamung des Wachstums innerhalb von 16 - 20 Stunden. Dann stoppt das Wachstum und in den folgenden 24 Stunden fallen die Zellen auf ihre Konzentration zu Beginn des Versuchs ab. Abb. 22 zeigt zusätzlich, daß die Anfangskonzentration der markierten Zellen ohne Einfluß auf die Verdoppelungsrate ist. Auffällig ist, daß bei hohen Hemmzellkonzentrationen der Peak der Zellvermehrung etwas früher erreicht wird als bei niedrigeren.

5.2.2 Untersuchung eventueller Störfaktoren

Als Störfaktoren, die das im vorigen Abschnitt dargestellte Ergebnis verfälscht haben könnten, kommen pH-Wert-Änderung, Toxinbildung, Schäden durch ^{3}H-Thymidin und Sauerstoffmangel in Frage. Die ersten drei Faktoren sind bereits durch die Anlage des Versuchs und die Kontrollproben ausgeschlossen worden. So blieb schließlich noch zu klären, ob die Sauerstoffdiffusion in den Schalen ausreichte, bei den eingesetzten hohen Zellkonzentrationen den Sauerstoffbedarf der Zellen zu decken.

5.2.2.1 Berechnung der Sauerstoffdiffusion

Bei Versuchen mit Säugerzellen auf Petrischalen stellt sich generell die Frage, ob die Sauerstoffkonzentration auf dem Schalenboden für ein ungestörtes Wachstum ausreicht, das sich nicht von den natürlichen Stoffwechselbedingungen unterscheidet. Wegen der auch heute noch bestehenden Schwierigkeiten, Sauerstoffkonzentrationen exakt und reproduzierbar zu messen, sollte das Problem zunächst rechnerisch angegangen werden.

Mathematisch läßt sich die Diffusion mit Hilfe der Fick' schen Gesetze klären.

Im 1. Fick' schen Gesetz $\frac{dn}{dt} = - q D \frac{dc}{dx}$ wird die Diffusion ohne Rücksicht auf die Änderung des Konzentrationsgradienten mit dem Fortschreiten der Diffusion beschrieben.

Dabei bedeuten:

n = Diffundierende Sauerstoffmenge
t = Diffusionszeit
q = Diffusionsquerschnitt
D = Diffusionskoeffizient, der die Anzahl der Mole des gelösten Stoffes ausdrückt, die in 1 sec. durch den Querschnitt 1 cm^2 beim Konzentrationsgefälle 1 hindurchgehen.
c = Konzentr. des gelösten Stoffes an der Stelle x.
x = Diffusionsstrecke.

Auf die Verhältnisse in der Zellkulturschale übertragen, stellt sich die Sauerstoffdiffusion so dar:

Zu Beginn des Versuchs bei frischem Medium herrscht in jeder Höhe der Mediumschicht Sauerstoffsättigung.

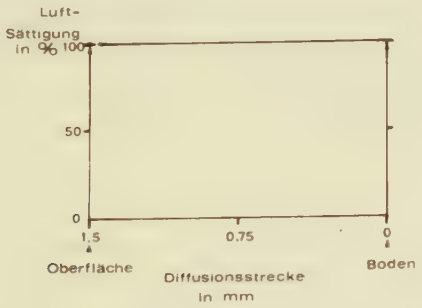

Abbildung 23: Abhängigkeit der O_2 Konz. von der Diffusionsstrecke.

1. Phase: Zu Beginn des Versuchs herrscht in jeder Höhe der Mediumschicht O_2 Sättigung.

Über der Oberfläche steht praktisch ein unbegrenzt großer Gasraum zur Verfügung. An der Grenzschicht Gas - Flüssigkeit soll zu jeder Zeit Sauerstoffsättigung herrschen. Auf dem Boden der Schale, wo die Zellen Sauerstoff verbrauchen, bildet sich eine sauerstoffarme Grenzschicht, in die Sauerstoff aus der gesättigten Lösung nachdiffundiert. Die Änderung der O_2-Konzentration über die Diffusionsstrecke ist schematisch aus der Abb. 24 zu ersehen.

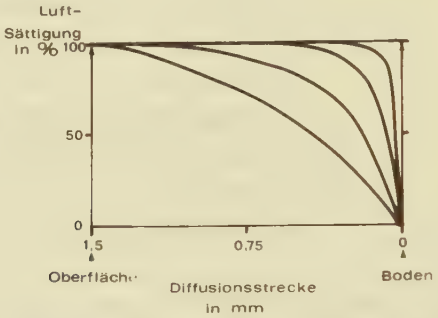

Abbildung 24: Abhängigkeit der O_2-Konzentration von der Diffusionsstrecke
2. Phase: Bei O_2 Verbrauch am Schalenboden nimmt die O_2-Konz. über die Diff. -Strecke ab.

Nimmt man an, die Zellen würden genau so viel Sauerstoff verbrauchen wie nachdiffundiert, so würde sich nach genügend langer Zeit ein Gleichgewicht einstellen (Abb. 25). Am Boden herrscht dann die O_2-Konzentration 0 % und an der Oberfläche 100 %.

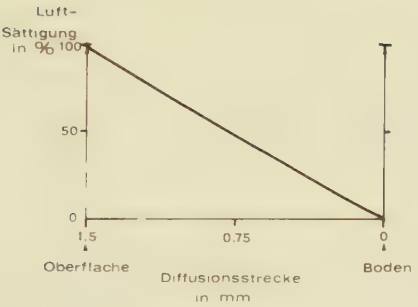

Abbildung 25: Abhängigkeit der O_2Konz. von der Diffusionsstrecke
3. Phase· Steht O_2Diff. und O_2 Verbrauch im Gleichgewicht, kommt es zu einem linearen O_2Konz. Gradienten.

Die auf dem Schalenboden ankommende O_2-Menge ist dann nach dem 1. Fick'schen Gesetz einfach zu errechnen, indem man den Differentialquotienten in einen Differenzquotienten umwandelt.

Dabei ist zu berücksichtigen, daß auch durch die Falconschalen, die aus Polystyrol bestehen, Sauerstoff diffundiert (Chapman et al., 1970). Wenn man die Werte aus der Literatur zugrunde legt, kommt man bei dem eben aufgezeigten Ansatz auf 1, 5 µg O_2/h, die durch den Schalenboden diffundieren. Dieser Wert muß noch zur Diffusion durch die Flüssigkeit addiert werden.

Problematisch bei dieser Berechnung ist vor allem die Annahme, an der Gas-Flüssigkeitsgrenzschicht herrsche immer Luftsättigung. Mehrere Autoren (Tsao, 1968; Hixon und Gaden, 1950, Phillips und Johnson, 1961) berichten von Suspensionskulturen, daß die Gas-Flüssigkeits-Interphase die Diffusion stärker hemmt als die Flüssigkeit selbst. Dabei ist auch die Zusammensetzung des verwendeten Mediums von Bedeutung.

Die O_2 Diffusionskonstante für die Versuchsbedingungen:
F 12-Medium + 10 % Serum bei 37°C ist bisher nicht beschrieben worden. Sie läßt sich aber annäherungsweise aus den Werten für die O_2Diffusion in Wasser und Serum ermitteln (Gertz und Loeschke, 1954).

D_{37} Wasser = $3,21 \times 10^{-5}$ $cm^2 \times sec^{-1}$

D_{37} Serum = $2,54 \times 10^{-5}$ $cm^2 \times sec^{-1}$

In die Rechnung wurde ein mittlerer Wert von 3×10^{-5} $cm^2 \times sec^{-1}$ eingesetzt.
Als weiterer Parameter zur Berechnung der Sauerstoffdiffusion war die gelöste Sauerstoffmenge bei Gassättigung im F 12-Medium nötig.
Sie wurde nach Begasung mit einem Gemisch von 95 % Luft und 5 % CO_2 bei 37°C und 760 mm Hg mit einem Biofluxgerät nach Tödt gemessen (Tödt, 1958).
Als Eichlösung diente $\frac{m}{15}$ Phosphatpuffer pH 7,4, in dem bei 37°C und 760 mm Hg 6,5 µg O_2/ml gelöst sind (Damaschke et al., 1953).
Bei der eingesetzten Goldamalgamelektrode entsprachen diesen 6,5 µg O_2 / ml 2,25 µA / ml.
Ergebnis der Messungen siehe Tabelle 3.

Tabelle 3

	Strom	O_2Menge
$\frac{m}{15}$ Phosphatpuffer luftgesättigt	2,25 µA / ml	6,5 µg O_2/ml
F 12 ohne Serum luftgesättigt	2,0 " "	5,78 " "
F 12 + 10% Serum 95% Luft 5% CO_2 gesättigt	1,7 " "	4,92 " "

Aus Tab. 3 ergibt sich, daß das F 12-Medium unter den Standardversuchsbedingungen im gasgesättigten Zustand 4,92 µg O_2/ml enthält.

Die Höhe der Mediumschicht über den Zellen konnte folgendermaßen berechnet werden.

Bei Schalen mit 50 mm Durchmesser und 5 ml Füllvolumen sind 47 % der Flüssigkeit im äußeren Rand von 5 mm versammelt (Chapman et al., 1970).

Bei unserem Füllvolumen von 4 ml sind also 53 % von 4 ml auf den zentralen Rest der Schale verteilt.

Restdurchmesser 40 mm = 1256 mm^2 Restfläche; darauf verteilen sich 53 % von 4 ml = 2,12 ml. Daraus ergibt sich die Füllhöhe zu

$$h = \frac{2120}{1256} = 1,67 \text{ mm.}$$

Mit diesen Werten läßt sich nach dem 1. Fick'schen Gesetz nach Übergang zum Differenzenquotienten $\frac{n}{t} = - q D \frac{c}{x}$ die O_2-Menge errechnen, die in die Wachstumszone auf dem Schalenboden diffundiert.

$c = 4,92$ µg O_2/ml, $x = 0,167$ cm, n soll errechnet werden,
$t = 1$ Std., $q = 20$ cm^2, $D = 3 \times 10^{-5} cm^2 \times sec^{-1}$

$$\frac{n}{sec} = \frac{20 \text{ cm}^2 \times 3,0 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ sec}^{-1} \times 4,92 \text{ µg } O_2 \text{ cm}^{-3}}{0,167 \text{ cm}}$$

$$n = = 17,68 \times 10^{-3} \text{ µg sec}^{-1} \quad \text{oder} \quad n = 63,64 \text{ µg } O_2 \text{ Std.}^{-1}$$

Dazu kommen 1,5 µg O_2 Std^{-1}, die durch das Polystyrol diffundieren, so daß insgesamt 65 µg O_2 pro Std unter Gleichgewichtsbedingungen die Wachstumszone durchlaufen. Diese Werte haben unter der Voraussetzung Gültigkeit, daß die Oberfläche der Flüssigkeit luftgesättigt ist.

Der Sauerstoffverbrauch von Säugerzellen in Kultur beträgt in Abhängigkeit von Spezies und Autor zwischen 4 - 10 - 14 x 10^{-6} µl O_2 / Zelle und Std. (Paul, 1961).

Nimmt man als mittleren Wert 10 x 10^{-6} µl O_2 / Zelle u. Stunde an, so ergibt sich ein Verbrauch bei Einsaat von 1 x 10^6 Zellen von 10 µl Sauerstoff pro Schale und Std. Oder 12,6 µg O_2 bei 1 Atm. und 37°C.

Bei Luftsättigung an der Flüssigkeitsoberfläche müßte die Sauerstoffdiffusion demnach 5 x 10^6 Zellen / Schale entsprechend 2, 5 x 10^5 Zellen / cm^2 ausreichen.

5.2.2.2 Sauerstoffkonzentrationsmessung in der Petrischale

Wegen der Unsicherheit, inwieweit die Gas- Flüssigkeitsgrenzschicht die Diffusion des Sauerstoffs beeinflußt, sollte das Ergebnis der Rechnung durch Messungen überprüft werden.
Zur Bestimmung des O_2-Konzentrationsgradienten in den Kulturschalen diente eine Platindrahtmikroelektrode, die mit Polystyrol überzogen war (Spitzendurchmesser 30 u).
Eine Falconschale mit 8 x 10^6 Zellen / Schale (4 x 10^5 Zellen / cm^2) wurde mit F 12-Medium in einer feuchten Kammer bei 37°C bebrütet. Die Begasung erfolgte mit Luft. Nachdem die Schale 4 Stunden ohne Erschütterung gestanden hatte, wurde die Elektrode mit einem Mikromanipulator in 120 u Schritten durch das Medium bis in die Zellschicht am Schalenboden eingefahren. Der an der Elektrode fließende Strom, der der O_2-Konzentration proportional ist, wurde mit einem Schreiber kontinuierlich aufgezeichnet.
Die Eichung der Elektrode erfolgte in drei temperierten, mit Eichgasen durchperlten Gefäßen. Das Ergebnis der Versuche ist in Abb. 26 dargestellt.

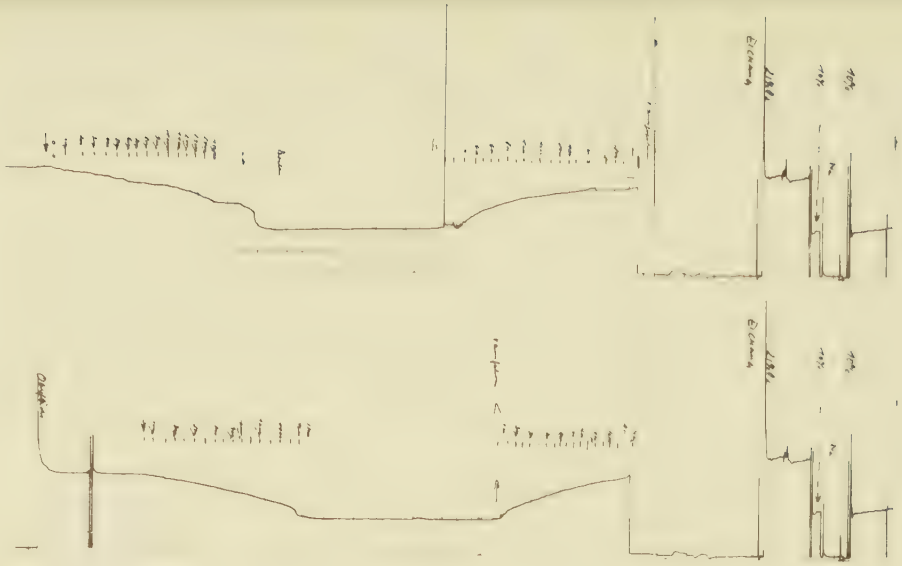

Abbildung 26: Messung des O_2 Konzentrationsgradienten in einer Einschichtzellkultur
(Polystyrolschale 80 mm Ø , Mediumhöhe 1,7 mm)

Luftdruck: 762, 5 mm Mg
Temperatur: 37° C
Wasserdampfsättigung
Begasung Luft + 5% CO_2

EHperm Zellen Konzentration 8×10^6 Zellen/Schale
$= 4 \times 10^5$ Zellen / cm^2

Die Abb. 26 zeigt zwei O_2 Gradientenmessungen an einer Kulturschale. Die Zellen hatten vor dem Versuch 4 Stunden im Versuchsaufbau unberührt gestanden. Die leichten Abweichungen der beiden Kurven voneinander kommen durch Driften der Sauerstoffelektrode zustande.
Die Sauerstoffkonzentration direkt in der Zellschicht lag im Bereich von 50 Torr.

Bei Messungen mit Zellkonzentrationen von 8×10^5 bis $1,5 \times 10^6$ Zellen/Schale kam praktisch kein O_2 Gradient zustande. Im gesamten Tiefenbereich der Schale herrschte Sauerstoffsättigung.

6. Diskussion

6.1 Allgemeine Problematik

Untersuchungen über die Kinetik der Kontaktinhibition können dazu dienen, die intrazelluläre Regulation des Zellwachstums zu klären.

Der zeitliche Verlauf der durch Zellkontakt ausgelösten Wachstumshemmung gibt die Möglichkeit, eine Beziehung der Hemmbereitschaft der Zelle zum Wachstumszyklus zu erkennen. Ein eventuelles Intervall zwischen dem Moment des Zellkontaktes und dem eigentlichen Wachstumsstopp gibt Aufschluß darüber, ob ein intrazellulärer Hemmechanismus bereits funktionsfertig vorhanden ist oder von der Zelle erst aufgebaut werden muß.

Die Verwendung von Zellen unterschiedlichen Malignitätsgrades läßt einen möglichen Einfluß der Transformation auf diesen Regelablauf erkennen.

Voraussetzung für eine solche Untersuchung ist eine Technik, die schlagartig Zellkonzentrationen erzeugen kann, die beim normalen Wachstumsablauf zur Kontaktinhibition führen würde. Außerdem ist es notwendig, die gehemmte Zellart von den verwendeten Hemmzellen zu unterscheiden.

Es wurden mit Tuschepartikeln markierte Zellen von Einschichtkulturen abtrypsiniert und auf eine dichte Zellage einer anderen Zellart ausgesät (Borek und Sachs, 1966). Diese Methode hatte für die in dieser Arbeit behandelte Problematik folgende entscheidende Nachteile:

Die Zellen mußten zur Einsaat auf den vorbereiteten Zellrasen abtrypsiniert werden. Die Proteasen stören jedoch den Kontaktinhibitionseffekt erheblich (Burger et al., 1972). Außerdem war eine exakte Kinetik der Kontaktinhibition nicht mehr durchzuführen, weil zuviel Zeit vergangen war, bis die Zellen ihre Verzögerungsphase überwunden hatten.

Auch die Markierung mit Kohlepartikeln war nicht deutlich genug für eine Auswertung mit einem automatisierten Zählverfahren. Das war jedoch Voraussetzung für eine Verwendung der Methode als biologischer Test.

Aus diesen Gründen wurden die zu testenden Zellen zuerst auf der Kulturschale in die exponentielle Wachstumsphase gebracht und dabei mit ^{3}H-Thymidin markiert. Erst dann wurden die Hemmzellen zugegeben. Um den störenden Einfluß der Proteasen auf die Hemmkinetik auszuschließen, mußten die Zellen in einer Suspensionskultur gezogen und von dort auf die Schale gebracht werden.

6.2 Chemostat

Im Hinblick auf die später vorgesehenen Untersuchungen über die chemische Natur des Rezeptor-Triggersystems sollte die Zellkultivierung in einem Chemostaten durchgeführt werden, in dem sich auch Wachstumskinetiken aufnehmen ließen, so daß die Anlage ebenfalls in einem biologischen Test eingesetzt werden konnte.
Um diesen Anforderungen zu genügen, mußte sie folgende Eigenschaften haben:

Die Kultivierungsbedingungen sollten definierbar und kontrollierbar sein.

Im Verlauf der Wachstumskinetik mußte ein zellfreier Mediumwechsel möglich sein.

Die Zellkonzentration mußte sich im Kulturgefäß schlagartig erhöhen lassen.

Die Probenentnahme sollte weitgehend automatisch erfolgen.

Es wurden bisher mehrere Chemostaten entwickelt, die wichtige Kultivierungsparameter kontrollieren können (Cherry und Hull, 1956; Cooper et al., 1959; Merchant und Hellman, 1960; Cohen und Eagle, 1961; Pirt und Callow, 1964; Telling und Elsworth , 1965; Herbert et al., 1965; Evans und Andresen, 1966; Hellman et al., 1967; Elsworth und Stockwell, 1968).

Diese Geräte dienen vor allem der Massenzucht von Zellen. Frisches Medium wird in den Fermenter zugeführt und die gleiche Menge an Zellsuspension wird entnommen. Durch diese Methode ist es möglich, Zellen dauernd im exponentiellen Wachstum zu halten. Um nicht zu viele Zellen zu entnehmen und damit das Gleichgewicht der Kultur zu stören, wurde die auslaufende Zellsuspension mit Hilfe der Trübungsmessung kontrolliert und davon abhängend der Mediumaustausch gesteuert (Björklund et al., 1961; Cooper et al., 1959; Best et al., 1963; Schlecht et al., 1968).

Die Kontrolle und Regulation des pH-Wertes erwies sich als sehr wichtig für ein ungehindertes Wachstum in der Suspensionskultur (Giffort et al., 1956; Mc Limans et al., 1957; Kuchler und Merchant, 1956; Barron und Karzon, 1957; Mackenzie et al., 1961).
Deshalb wurde besonderer Wert auf die Entwicklung einer automatischen pH-Kontrolle gelegt.

Bei den Bikarbonat gepufferten Medien wurde die CO_2 Konzentration der Gasphase entsprechend dem aktuellen pH geregelt (Callow und Pirt, 1956; Vestergaar -Bogind, 1962; Telling und Stone, 1964; Moore und Ulrich, 1965). Aber auch Zugabe von isotoner NaOH, Bicarbonatlösung und HCl wird angewandt.

Aus der Glaselektrode diffundierendes KCl ist auf das Wachstum der Zellen nicht ohne Einfluß, wenn über längere Zeit in Fermentern unter 4 Liter gearbeitet wird (Telling und Elsworth , 1965).

Die Sauerstoffkonzentration im Medium ist bei einigen Geräten kontinuierlich gemessen worden (Evans et al., 1970; Daniels et al., 1965; Elsworth und Stockwell, 1968).
Diese Messung ist aber für den Dauerbetrieb noch nicht befriedigend gelöst worden, da die bisher verwendeten Sauerstoffelektroden nach einigen Stunden instabil werden und außerdem driften (Elsworth und Stockwell, 1968; Kessler, 1973).

Bei allen diesen Chemostaten ließ sich ein Mediumwechsel nur durch Abnahme von Zellsuspension und Ersatz mit frischem Medium durchführen. Eine Wachstumskinetik kann man in diesen Geräten nicht aufnehmen.

Um eine Suspensionskultur mit zellfreiem Mediumwechsel über längere Zeit zu betreiben, ist die Dialyse versucht worden (Mount und Moore, 1962; Gori, 1964). Die Mediumerneuerung gelang aber nicht vollständig, obwohl außerordentlich große Mediummengen zur Dialyse verwendet wurden.

In Langzeitkulturen die Zellen mit Filtern zurückzuhalten, scheiterte bisher daran, daß die verwendeten Filterfritten nach kurzer Zeit verstopft waren (Cherry und Hull, 1956; Averdunk und Voss, 1968).
Deshalb mußte bei der Entwicklung eines eigenen Chemostaten,insbesondere für das Filtrieren der Zellsuspension, eine geeignete Lösung gefunden werden.

Das Prinzip des freispülenden Rührers über einem Membranfilter am Boden des Kulturgefäßes hat sich eindeutig als Erfolg erwiesen.
Im Gegensatz zu Averdunk und Voss (1968), die alle 4 Stunden die verwendete Filterkerze wechseln mußten, blieb die hier beschriebene Anlage 2 Monate ohne Filterwechsel funktionstüchtig. Für eine längere Laufdauer war es ohne weiteres möglich, die Zellen ohne Schädigung in ein neues Kulturgefäß umzupumpen. Die Anlage gestattete es, mehrere Gefäße mit unterschiedlichen Zellarten parallel zu betreiben. Die maximal erzielte Zellkonzentration in einer normalen Wachstumskinetik betrug $2,5 \times 10^6$ Zellen/ml. Sie lag um 40% über den Werten, die Capstick (1937) mit BHK Zellen in einer Batchkultur erreichte und dreimal höher als in dem von Averdunk et al. (1968) beschriebenen Gerät. Dabei wurde F12 Medium mit 10% Kalbsserum wie auch bei Einschichtkulturen verwendet.

Das Ziel, mit diesem Gerät schlagartig die Zellkonzentration in der Kultur zu erhöhen, ist erreicht worden. Die Ergebnisse sind aber noch vorläufig.

Der pH ließ sich über die ganze Kultivierungszeit durch manuelle Gasgemischregelung konstant halten. Dabei war eine Kontrolle nur etwa alle 2 Tage erforderlich.
Es besteht jedoch die Möglichkeit, die pH Regulation nach den Angaben von Vestergaard-Bogind(1962) zu automatisieren.

Zwischen der Aufnahme von Zellkinetiken ließ sich die Kultur auch als herkömmlicher Cytostat schalten. Dabei wurde die Zellsuspension ungefiltert über die vorhandenen Entnahmestutzen abgepumpt.

Diese Methodik ist bereits in allen Einzelheiten beschrieben worden (Mc Limans et al., 1957; Cooper et al., 1959; Schlecht et al., 1968).

Das Makrolonmaterial hielt bisher 1 Jahr dem Routinebetrieb mit den Sterilisationen stand. Es wird jedoch mit der Zeit etwas trübe, ohne dadurch aber das Zellwachstum zu beeinträchtigen. (Die Reinigung mit Nitriergemisch überstand das Gerät ohne Schaden).
Die Silikonschläuche in der Peristaltikpumpe(Desaga Modell 13 19 00) hielten den Dauerbetrieb nur 3 Wochen aus. Sie wurden deshalb routinemäßig alle 14 Tage durch vorrätig gehaltene Schlauchsätze ersetzt.

Die automatische Probenentnahme ist ebenfalls mit Erfolg durchgeführt worden. Im Gegensatz zu Bölsksföldi und Eliasson (1973) wurde jedoch der Fraktionssammler nicht gekühlt, sondern die Proben bei der Entnahme mit Formalin versetzt. Das hatte den Nachteil, daß sie wegen des Verdunstungsverlustes nicht länger als einen Tag lang stehenbleiben konnten.

6.3 Zählapparatur

Bei der Versuchsplanung zur Kontaktinhibition in vitro stellte sich bald heraus, daß mit so erheblichen Probenumfängen gerechnet werden mußte, daß die visuelle Auszählung unter dem Mikroskop nicht möglich war. Deshalb wurde nach einem System zur maschinellen Auswertung gesucht.
Es mußte folgende Eigenschaften haben:

Zählen gefärbter und autoradiographierter Zellen.

Erfassen eines möglichst großen Teils der Petrischalen, um eine mangelnde Gleichverteilung der Zellen auszugleichen.

Möglichst schnelles Arbeiten und einfache Bedienung.

Billig in der Anschaffung.

Zur Auswertung histochemischer Farbreaktionen wurde eine Reihe von Mikroskop-Photometern gebaut (Caspersson,1940; Pollister und Ris, 1948; Pollister und Moses,1949; Deeley, 1960), die die Extinktion einzelner Zellen oder Zellareale messen konnten.

Diese Methode wurde mit dem Ziel weiterentwickelt, in der Cytologie bei Abstrichen die verschiedenen Zellarten automatisch zu unterscheiden (Preston, 1962; Diacumakos et al., 1962).
Mit verschiedenen Verfahren wurden die Objekte auf kleinster Fläche (30 µ Bereich) abgetastet (Caspersson und Lomakk, 1962; Bloom, 1966; Kopac und Harris, 1962; Freed , 1962). Die Möglichkeit der automatischen Formenerkennung und Zelldifferenzierung sollte dann durch Analog-Digitalwandlung der Dichtewerte und Auswertung in einem Computer gegeben werden (Mendelsohn et al., 1964).

Eine Reihe von äußerst aufwendigen Mikroskop-Photometern mit Mikroscanneinrichtungen sind heute kommerziell erhältlich (Zeiss UMSP, Leitz MPV, Imanco, Phywe u. a.).
Da diese Geräte auf das Abtasten kleinster Flächen ausgerichtet sind, waren sie für unser Problem nicht geeignet.

Ein Gerät zur Zählung von Bakterienkolonien, welches die ganze Petrischale auf einmal erfaßt, ist von Ingels et al. (1968) beschrieben worden. Diese Arbeitsgruppe suchte nach einem einfachen System für den Laborgebrauch, da die bereits existierenden Geräte für Bakterienkoloniezählung (Malligo, 1965; Glaser und Wattenburg, 1966) zu komplex und viel zu aufwendig waren. Ingels Meßprinzip fußte auf kollektorlinsenähnlichen Eigenschaften der Bakterienkolonien, die im Durchlicht einen Lichtstrahl

konzentrierten und auf eine Reihe von Fototransistoren warfen, durch die die Petrischale im Verlauf einer Schalenumdrehung abgetastet wurde.

Dieses Meßprinzip ließ sich jedoch nicht ohne weiteres auf die Zählung von Zellen übertragen, da es auf den linsenähnlichen Eigenschaften der Bakterienkolonien beruhte.

Ein Mikroskop mit automatischer Abfahreinrichtung zur Auszählung autoradiographierter Spuren von Elementarteilchen wurde von Cohn und Gold (1972) beschrieben. Dieses Gerät benötigt allerdings 10 Stunden zur Abtastung von 1 cm^2 Fläche. Diese Zeit war für unsere Verhältnisse nicht diskutabel.

Ein ganz anderes außerordentlich aufwendiges Verfahren der Partikelanalyse wird zur Zeit von der Industrie intensiv entwickelt (Zeiss, Mikrovideomat, Leitz Classimat, Imanco Quantimet, Millipore u.a.). Es beruht darauf, daß die zu untersuchenden Teilchen über ein Fernsehmikroskop aufgenommen und in Grauwerte umgesetzt werden. Das Zeilenraster des Fernsehbildes diskriminiert die Objekte nach ihrer Größe, ein Grauwertdiskriminator nach ihrer Schwärzung (Cole, 1966; Fisher, 1966; Zimmer, 1969). Es können Anzahl, Umfang, Fläche und noch weitere Parameter gemessen werden (Fisher, 1971; Kamin et al., 1970; Allamen und Coleman, 1971; Cole, 1970). Das Hauptproblem besteht bei allen diesen Geräten darin, daß sie nur konstrastreiche, wenig gezackte Objekte für die Auswertung brauchen (Gundlach, 1972).

Da der besonders große finanzielle Aufwand, den diese Apparate erfordern, für das im Grunde einfache Zählproblem nicht angemessen erschien und auch wegen fehlgeschlagener Vorversuche an solch einem Gerät sollte eine eigene, einfache Lösung des Zählproblems verwirklicht werden. Sie bestand darin, die Petrischalen unter dem Mikroskop in einer engen Spirale abzufahren, die vorbeilaufenden Zellen mit einer Fotodiode in zählbare Impulse umzuwandeln und von einem einfachen Additionscounter zählen zu lassen.

Die entwickelte Zählapparatur hat die gestellten Bedingungen voll erfüllt. Sie ist in der Lage, die bei den Kontaktinhibitionsversuchen anfallenden autoradiographierten Zellen quantitativ und richtig auszuzählen.
Sie ist überschaubar und billig herzustellen, da außer dem ja meist vorhandenen Mikroskop nur der Scanningtisch mit etwas Aufwand gebaut werden müßte.
Elektronische Counter sind auf dem Markt preiswert zu haben und die Übertragungselektronik besteht aus einfachen Bauteilen.
Die Zählapparatur mißt innerhalb des untersuchten Bereichs bis 2×10^5 Zellen / Schale linear. Ein nennenswerter Koinzidenzfehler tritt nicht auf.
Die Abweichung der einzelnen Messungen untereinander liegt bei 1, 5 - 2%. Durch Vergrößerung der ausgewerteten Fläche von 6, 5% auf 40% der Gesamtfläche, also um das Sechsfache, wird die Standardabweichung des Mittelwerts um den Faktor $\frac{40}{6,5} = 2,5$ vermindert. Statt 10 - 15% Fehler entstehen jetzt 4 - 5% Fehler.

Ein weiterer wichtiger Vorteil besteht darin, daß die Zähldauer einer einzelnen Schale mit Einlegen in das Gerät von 15 - 35 Minuten auf 3 - 4 Minuten verringert werden konnte. Dadurch lassen sich die anfallenden Versuchsumfänge leicht bewältigen.

Um die hier beschriebene Zählapparatur auch für Routinezählungen im Labor bei gefärbten Zellen verwenden zu können, mußte nach einer kontrastreichen Kernfärbung gesucht werden. Das Zellplasma durfte dabei nicht gefärbt sein, da die Plasmaausläufer zu Fehlmessungen führen und aneinanderliegende Zellen sonst nicht einzeln gezählt werden.
Weiterhin mußte die Kernfärbung so stark sein, daß bei hoher Vergrösserung die Pigmentdichte noch ausreicht, ein verwertbares Signal zu erzeugen. Diese beiden Voraussetzungen wurden von den gängigen Kernfärbungen nicht erfüllt (Giemsa und Giemsavariationen, Hämalaun, Chromlack).

Die Kernimprägnation mit Silber nach Heimer (1970) ist anscheinend geeignet, dieses Problem zu lösen.

6.4 Zeitlicher Verlauf der Kontaktinhibition

Mit den beiden beschriebenen Methoden war es nun möglich, die Hemmversuche ohne Proteaseneinfluß mit kurzen Meßabständen durchzuführen.

Es wurde darauf verzichtet, maligne und nicht tumorbildende Zellen unterschiedlicher Zellinien zu vergleichen, da erhebliche Unterschiede zwischen verschiedenen Zellinien ein und derselben Spezies bestehen (Abercrombie und Ambrose, 1962; Eagle et al., 1968; Ursprung ed., 1968). Statt dessen wurden Zellen unterschiedlicher Malignität aus demselben Zellklon gezüchtet.
Ob dabei die verwendeten EHnorm Zellen wirklich "normal" sind, darf bezweifelt werden. Schon das Wachstum in der Suspensionskultur weist auf eine Transformation hin (Hayflick und Moorehead, 1961; Moore und Ulrich, 1965). Aus der Testung auf Mäusen kann man jedoch erkennen, daß sich die Zellen sicherlich in ihrem Malignitätsgrad unterscheiden.

Beide untersuchten Malignitätsstufen teilten sich nach Eintritt der Kontaktinhibitionsdichte ungestört noch einmal in einer Zeit zwischen 16 und 20 Stunden. In den folgenden 24 Stunden fielen die Zellen dann auf ihre Ausgangskonzentration zurück, in der sie auch in weiteren 48 Stunden blieben. Der Effekt war bei allen untersuchten Hemmkonzentrationen der gleiche.
Ergänzend zeigte sich, daß genau 24 Stunden nach der Einsaat, also zum Zeitpunkt der Zellverminderung, ^{3}H-Aktivität im überstehenden Medium der Schalen auftrat. Autoradiographierte Kontrollen von Zentrifugaten der Schalenüberstände zeigten jedoch keine geformten Zellen.
Die Aktivität kann also nicht von lebenden Zellen stammen.

Es erhebt sich nun die Frage, ob bestimmte äußere Störfaktoren diesen Zellabfall bewirkt haben könnten. In der Literatur wird dazu O_2-Mangel, pH Abfall, Toxinanreicherung oder Schädigung der Zelle durch

^{3}H-Thymidin (Ceccarini und Eagle, 1971; Schutz und Mora, 1968; Whitmore und Gulyas, 1966) diskutiert.

Ein Tritiumeinfluß ist durch die ebenfalls mit gleicher Aktivität markierte Nullprobe ausgeschlossen. Das Wachstum der Nullprobe war unbeeinflußt. Ein pH Abfall hat durch die differenzierte Begasung der Schalen nicht stattgefunden. Es ließ sich an dem im Medium enthaltenen Indikator ein konstanter pH Wert erkennen. Auch zeigten zusätzliche Versuche in der Suspensionskultur im Gegensatz zu Ceccarini und Eagle (1971) keinen Einfluß des pH auf die Höhe der Kontaktinhibitionskonzentration bei unseren Zellen in dem dort untersuchten Bereich zwischen pH 6, 8 und 7, 4.

Ein Toxineinfluß ist sehr unwahrscheinlich, da die Kontrollprobe, bei der "gebrauchtes" Medium aus kontaktinhibierten Suspensionskulturen verwendet worden war, keine Beeinflussung des exponentiellen Wachstums zeigte.

Ein Sauerstoffmangel konnte durch Messungen mit einer O_2-Mikroelektrode in konfluierenden Kulturen ausgeschlossen werden. Bei 4×10^5 Zellen/cm^2, also der 2 - 4fach höheren Zellkonzentration, wie sie im Versuch verwendet wurde, betrug der O_2-Partialdruck in der Wachstumsschicht noch 30 - 50 Torr. Die maximale Mitochondrienatmung findet aber noch bei 2, 5 - 3 Torr statt (Kessler und Lübbers, 1964). Ein Einfluß von dieser Seite läßt sich also mit einiger Sicherheit ausschließen.

Eine Abhängigkeit des Inhibitionseffektes von einer bestimmten Phase des Zellzyklus ist nicht vorhanden. Bei den verwendeten nicht synchronisierten Zellen müßte eine solche Abhängigkeit die Anstiegssteilheit der Wachstumskurve verringern. Das ist jedoch nicht der Fall.

Man kann also den Schluß ziehen, daß durch den Eintritt der Kontaktinhibitionskonzentration alle Zellen gleichzeitig dazu gebracht werden, nach einer Teilung die halbe Population absterben zu lassen.

Dieses Phänomen stützt durchaus die Burgersche Theorie, daß Triggermechanismen auf der Zellmembran durch den Zellkontakt aktiviert wer-

den und einen hemmenden Einfluß auf die DNS und Makromolekülsynthese ausüben. Da genau die Hälfte der Kultur abstirbt, kann man darüber hinaus annehmen, daß im Verlauf der Zellteilung durch den Zellkontakt zwei verschiedenartige Zellen entstanden sind. Die eine lebt weiter, die andere ist zum Absterben programmiert. Die Möglichkeit einer solchen asymmetrischen Teilung wurde von Stewart (1972) anhand von Befunden bei Bakterien in einer Übersicht neuerer Literaturhinweise diskutiert.

7. Zusammenfassung

Zur Klärung des Kontaktinhibitionsvorgangs bei Säugerzellen wurde mit neuen Techniken die Kinetik des Kontaktinhibitionsverlaufs untersucht. Dazu wurde ein Chemostat auf dem Filterprinzip entwickelt, der willkürliche Zellkonzentrierung während des Versuchs gestattet und unter definierten Bedingungen kinetische Untersuchungen ermöglicht. Die Anlage lief 2 Monate, ohne daß der Filter verstopfte.

Zur automatischen Auswertung autoradiographierter Zellen auf Petrischalen wurde eine Zählapparatur konstruiert, die mit einer Genauigkeit von 4 - 6% die markierten Zellen auf einer Schale auszählt.

Der Verlauf der Kontaktinhibition in Petrischalen nach Zugabe von Hemmzellen unterschiedlicher Konzentration und Malignität wurde untersucht. Dabei zeigte sich, daß Zellen nach Eintritt der Kontaktinhibitionskonzentration noch eine Generation lang ungestört weiterwachsen und in den folgenden 24 Stunden auf die Ausgangskonzentration zurückfallen, in der sie dann bleiben.

8. Literaturverzeichnis

ABERCROMBIE, M . & HEAYSMAN, J. E. M. (1953)
Exp. Cell Res., 5: 111

ABERCROMBIE, M., HEAYSMAN, J. E. M. & KARTHAUSER, H. M. (1957)
Exp. Cell Res., 13: 276

ABERCROMBIE, M. & AMBROSE, E. J. (1958)
Exp. Cell Res., 15: 332

ABERCROMBIE, M. & AMBROSE, E. J. (1962)
Cancer Res., 22: 525

AGOL, V. I., GERSHANOVITCH, V. N. & ETINGOF, R. N. (1959)
Biochimia, 24: 101 (Moskwa)

ALLAMEN, T. R. & COLEMAN, D. S. (1971)
in "Materials Technology" Metals and Materials
p. 32

ARNDT-JOVIN, P. J. & BERG, P. (1971); Virology 8: 716

AUB, J. C., TIESLAU, C. & LANKESTER, A. (1963)
Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 50: 613

AVERDUNK, R. & VOSS, H. (1968)
Zbl. Bakt. I. Abt. Orig., 207: 265

BAKER, J. B. & HUMPHREYS, T. (1971)
Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 68: 2161

BARRON, A. L. & KARZON, D. T. (1957)
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 94:393

BERWALD, Y. & SACHS, L. (1963)
Nature 200: 1182

BERWALD, Y. & SACHS, L. (1965)
J. Nat. Cancer Inst., 35: 641

BEIERLE, J. W. (1968); Science 161: 798

BEST, N. H., MILLS, S., LEACH, K. K., DURHAM, N. N. &
LEACH, F. R. (1963)
Exp. Cell Res., 31: 13

BJÖRKLUND, B., BJÖRKLUND, V. & PAULSSON, J. E. (1961)
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 108: 385

BLOOM, A. (1966) in " Introduction to quantitative cytochemisty"
p. 437 (ed. Wied) Academic Press
N. Y. - London

BÖLCSFÖLDI, G. & ELIASSON, E. (1973)
Analyt. Biochem., 55: 626

BOREK, C. & SACHS, L. (1966)
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 56: 1705

BOYD, W.C. (1954); Proteins 2: 789

BROSEMER, R.W. & RUTTER, W.J. (1961)
Exp. Cell Res., 25: 101

BRYANT, J.C., SHILLING, E.L. & EARLE, W.R. (1958)
J. Nat. Cancer Inst., 21: 349

BURGER, M.M. & GOLDBERG, A.R. (1967)
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 57: 359

BURGER, M.M. (1969); Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 62: 994

BURGER, M.M. & NOONAN, K.D. (1970); Nature 228: 512

BURGER, M.M. (1970); Nature 227: 170

BURGER, M.M., BOMBIK, B.M., BECKENRIDGE, B.Mc. &
SHEPPARD, J.R. (1972)
Nature New Biol., 239: 161

BURGER, M.M. (1973); Fed. Proc., 32: 91

CALLOW, D.S. & PIRT, S.J. (1956)
J. Gen. Microbiol., 14: 661

CAPSTICK, P.B. (1937); Proc. Roy. Soc. Med., 30: 1062

CASPERSSON, T. (1940); J. Roy. Microscop. Soc., 60: 8

CASPERSSON, T. & LOMAKK, G. (1962)
Ann. N.Y. Acad. Sci., 97: 449

CECCARINI, C. & EAGLE, H. (1971)
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 68: 229

CHAPMAN, J.D., STURROCK, J., BOAG, J.W. & CVOKALL, J.O.
(1970); Int. J. Radiat. Biol., 17: 305

CHERRY, W.R. & HULL, R.N. (1956); Anat. Rec., 124: 483

CLARKE, G.D., STOKER, M.G.P., LUDLOW, A. & THORNTON, M.
(1970); Nature 227: 798

CLINE, M.J. & LIVINGSTON, D.C. (1971)
Nature New Biol., 232: 155

COHEN, E.P. & EAGLE, M. (1961)
J. Exp. Med., 113: 467

COHN, CH.E. & GOLD, R. (1972); Rev. Sci. Instr., 43: 12

COLE, M. (1966); Microscope 15: 148

COLE, M. (1970); in "Advances in Image Analysis 3rd metallographic conference

COOPER, P.D., WILSON, J.N. & BURT, A.M. (1959)
J. Gen. Microbiol., 21: 702

COOPER, H.L. & BLACK, P.H. (1964)
J. Cell. Comp. Physiol., 64: 201

DAMASCHKE, K., TÖDT, F., BURK, D. & WARBURG, O. (1953)
Biochem. Biophys. Acta 12: 347

DANES, B.S. & PAUL, J. (1961)
Path. Biol., 9: 571

DANIELS, W.F., PARKER, D.A., JOHNSON, R.W. & SCHNEIDER, L.E. (1965); Biotechn. Bioeng., 7: 529

DAWE, C.J., POTTER, M. & LEIGHTON, J. (1958)
J. Nat. Cancer Inst., 21: 753

DE BRUYN, W.M. (1958); in " Jaarboek van Kankeronderzoek en Kankerbestrijding in Nederland" p. 94

DE BRUYN, W.M. (1961); Path. Biol., 9: 569

DEELEY, E.M. (1960); Biochem. Pharmacol., 4: 104

DEMUT, F. & RIESEN, I.V. (1928)
Arch. Exp. Zellforsch., 6: 146

DEMUT, F. & MEIER, R. (1929)
Biochem. Ztschr., 212: 399

DIACUMAKOS, E.G., DAY, E. & KOPAC, M. (1962)
Ann. N.Y. Acad. Sci., 97: 498

DÖHNER, L. (1961); Arch. Ges. Virusforsch., 11: 453

DULAK, N.C. & TEMIN, M.M. (1973)
J. Cell. Physiol., 81: 153

DULBECCO, R. & STOKER, M.G.P. (1970)
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 66: 204

DULBECCO, R. (1970); Nature 227: 802

EAGLE, M., LEVINE, E.M. & KOPROWSKI, M. (1968)
Nature 220: 266

ELSWORTH, R. & STOCKWELL, F.T.E. (1968)
Progr. Biochem.

EVANS, C.G.T., HERBERT, D. & TEMPEST, D.W. (1970)
in "Methods in Microbiol." 2: 277
(ed. Norris & Ribbons Acad. Press N.Y. -London)

EVANS, V.J. & ANDRESEN, W.F. (1966)
J. Nat. Cancer Inst., 37: 247

FISHER, C. (1966); Soc. Anal. Chem., 77: 94

FISHER, C. (1971); Microscope 19: 1

FOLEY, G.E. & HANDLER, A.M. (1957)
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 94: 661

FOLEY, G.E., ADAMS, R.A. & CRAIG, J.M. (1962)
Nat. Cancer Inst. Monogr., 7: 173

FRANK, W., RISTOW, H.-J. & ZABEL, S. (1970)
Eur. J. Biochem., 14: 392

FREED, J.J. (1962); Exp. Cell Res., 26: 327

FROESE, G. (1971); Exp. Cell Res., 65: 297

GANTT, R.R., MARTIN, J.R. & EVANS, V.J. (1969)
J. Nat. Cancer Inst., 42: 369

GARCIA-GIRALT, E., BERUMEN, L. & MACIEIRA-COELHO, A. (1970)
J. Nat. Cancer Inst., 45: 649

GERSHANOVITCH, W.N., AGOL, W.I., ETINGOF, R.N. &
DZAGUROV, S.G. (1958)
Biochimia 23: 453 (Moskwa)

GERTZ, K.M. & LOESCHKE, H.M. (1954)
Ztschr. Naturforsch., 9 b: 1

GEY, G.O., GEY, M.K., FIROR, W.M. & SELI, W.O. (1949)
Acta Unio Internat. Cancr., 6: 706

GIFFORT, G.E., ROBERTSON, H.E. & SYVERTON, J.T. (1956)
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 93: 321

GLASER, D.A. & WATTENBURG, W.H. (1966)
Ann. N.Y. Acad. Sci., 139: 243

GORI, G.B. (1964); Appl. Microbiol., 12: 115

GREEN, M., HENLE, G. & DEINHARD, F. (1958)
Virology 5: 206

GREENE, A.E., CORIELL, L.L. & LEHR, H.B. (1969)
Cryobiology 6: 289

GUNDLACH, H. (1972); Leitz-Mitt. Wiss. u. Techn. 1, 3: 91

GUMINSKA, M. & BORYSIEWICZ, J. (1962)
Acta Biochim. Pol., 9: 71

GURNEY, T. (1969); Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 62: 906

HAM, R.G. (1965); Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 53: 288

HARRIS, M. (1956); Brit. J. Exp. Path., 37: 512

HAYFLICK, L. & MOOREHEAD, P.S. (1961)
Exp. Cell Res., 25: 585

HEIMER, L. (1970); in "Contemporary Research methods in Neuroanatomy" (ed. Nauta, Ebbeson) p. 162
Springer Verlag Berlin-Heidelberg-N. Y.

HELLMAN, A.J., REGAN, J. & MARTIN, D. (1967)
Appl. Microbiol., 15: 201

HERBERT, D., PHIPPS, P.J. & TEMPEST, D.W. (1965)
Lab. Pract., 14: 1150

HIXON, A.W. & GADEN, E.L. (1950)
Industr. Erg. chem., 42: 1792

HOLLEY, R.W. & KIERNAN, J.A. (1968)
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 60: 300

HOMBURG, C.J., BOS, C.J., DE BRUYN, W.M. & EMMELOT, P. (1961); Cancer Res., 21: 353

HSU, T.C. (1960); J. Nat. Cancer Inst., 25: 1339

HSU, T.C. & MOOREHEAD, P.S. (1957)
J. Nat. Cancer Inst., 18: 463

HSU, T.C. & KLATT, O. (1959)
J. Nat. Cancer Inst., 22: 313

HUMPHREYS, T.L. (1972); in "Cell Interaction " p. 264
(Silvestri, L., ed.) North Holland Publ. Comp.
Amsterdam-London

ICHIKAWA, Y., PORAN, M. & SACHS, L. (1969)
J. Cell. Physiol., 73: 43

INBAR, M. & SACHS, L. (1969); Nature 223: 710

INGELS, N.B., DAUGHTERS, G.T. & BURZIO, A. (1968)
Rev. Sci. Instruments 39: 115

JOHNSON, G.S., FRIEDEMAN, R.M. & PASTAN, I. (1971)
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 68: 425

KAMIN, G., KLUGE, N., MÜLLER, W. & RZEZNIK, J. (1970)
Leitz-Mitt. Wiss. u. Techn. Sonderheft 1

KESSLER, M. & LÜBBERS, D.W. (1964)
Pflügers Arch. Ges. Physiol., 281: 50

KESSLER, M. (1973); in "Oxygensupply" (Kessler et al., ed.)
p. 81, Urban & Schwarzenberg
München-Berlin-Wien

KLEIN, E. (1959); Cancer Res., 19: 343

KOPAC, M.J. & HARRIS, J. (1962)
Ann. N.Y. Acad. Sci., 97: 331

KOPROWSKI, H., PONTEN, J.A., JENSEN, F., RANDIN, R.G., MOOREHEAD, P.S. & SAKSKELA, E. (1962)
J. Cell. Comp. Physiol., 59: 281

KRONTOWSKI, A.A. & BRONSTEIN, I.A. (1927)
Arch. Exp. Zellforsch., 3: 32

KRUSE, P.F. & MIEDEMA, E. (1965)
J. Cell. Biol., 27: 273

KUCHLER, J. & MERCHANT, D.J. (1956)
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 92: 805

LESLIE, I., FULTON, W.C. & SINCLAIR, R. (1956)
Biochem. J., 63: 18 P

LEVAN, A. & HANSCHKA, T.S. (1953)
J. Nat. Cancer Inst., 14: 1

LEVAN, A. & BIESELE, J.J. (1958)
Ann. N.Y. Acad. Sci. 71: 1022

LEVINE, E.M., BECKER, Y., BOONE, C.W. & EAGLE, H. (1965)
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 53: 350

MACKENZIE, C.G., MACKENZIE, J.B. & BECK, P. (1961)
J. Biophys. Biochem. Cytol., 9 : 41

MACPHERSON, I. (1963); J. Nat. Cancer Inst., 30: 795

MALLIGO, J.E. (1965); Appl. Microbiol., 13: 931

MARCUS, P.J., CIECIURA, S.J. & PUCK, T.T. (1956)
J. Exp. Med., 104: 615

Mc LIMANS, W.F., DAVIS, E.V., GLOVER, F.L. & RAKE, G.W. (1957); J. Immunol., 79: 428

MENDELSOHN, M.L., KOLMAN, W.A. & BOSTORM, R.C. (1964)
Ann. N.Y. Acad. Sci. 115: 998

MERCHANT, D.J. & HELLMAN, K.B. (1962)
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 110: 194

MERYMAN, H.T. (1957); Proc. Roy. Soc. Med., 147: 452

MERYMAN, H.T. (1962); Nat. Cancer Inst. Monogr., 7 : 1

MOORE, G.E. & ULRICH, K. (1965)
J. Surg. Res., 5: 270

MOUNT, D. & MOORE, G.E. (1962)
Tissue Culture Ass. Meeting, Washington; Zit. nach Moore u. Ulrich (1965)

NAGINGTON, J. & GREAVES, R.I.N. (1962)
Nature 194: 993

NOONAN, K.D. (1972); Thesis Princeton Univ.

NOWELL, P.C. (1960); Cancer Res., 20: 462

OTTEN, J., JOHNSON, G.S. & PASTAN, I. (1971)
Biochem. Biophys. Res. Commun., 42: 1192

OZANNE, B. & SAMBROOK, J. (1971)
Nature New Biol., 232: 156

PAUL, J. & PEARSON, E.S. (1957)
Exp. Cell Res., 12: 212

PAUL, J. (1959); J. Exp. Zool., 142: 475

PAUL, J. (1961); Path. Biol., 9: 529

PAUL, D., LIPTON, A. & KLINGER, J. (1971)
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 68: 645

PHILLIPS, D.H. & JOHNSON, M.J. (1961)
Biotechnol. Bioeng., 3: 277

PIRT, S.J. & CALLOW, D.S. (1964)
Exp. Cell Res., 33: 413

POLLAK, R.E., GREEN, M. & TODARO, G.J. (1968)
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 60: 126

POLLISTER, A.W. & RIS, H. (1948)
Cold Spring Habour Symp. Quant. Biol. 12:147

POLLISTER, A.W. & MOSES, M.J. (1949)
J. Gen. Physiol., 32: 567

PRESTON, K. Jr. (1962); Ann. N.Y. Acad. Sci., 97: 482

ROBBINS, J.H. & BURK, P.G. (1973)
Cancer Res., 33: 929

RUBIN, H. & REIN, A. (1967); in "Growth regulation substances for animal cells in culture" (ed. Defendi u. Stoker) Wistar Inst. Press Phil.

RYAN, J.R. & CURTIS, G.L. (1973)
in" The Role of cyclic nucleotides in carcinogeneseis" Miami Winter Symp., 6: 1
(ed. Schultz, Gratzner)Academic Press N.Y. - London

SANFORD, K.K., SHILLING, E.L., DUCHESNE, E., LIKELY, G.D. & BECKER, M.M. (1950)
J. Nat. Cancer Inst., 11: 351

SANFORD, K.K. & EARLE, W.R. (1954)
J. Nat. Cancer Inst., 15 :215

SANFORD, K.K. (1958); Cancer Res., 18: 747

SANFORD, K.K., HOBBS, G.L. & EARLE, W.R. (1956)
Cancer Res., 16: 162

SCHLECHT, S., RING, K., KUTSCHER, J. & ESCHWEILER, W. (1968)
Zbl. Bakt. I. Abt. Orig., 206: 246

SCHUTZ, L. & MORA, P.T. (1968)
J. Cell. Physiol., 71: 1

SELA, B., LIS, H., SHARON, N. & SACHS, L. (1970)
J. Membr. Biol., 3:267

SEFTON, B.M. & RUBIN, H. (1970)
Nature 227: 843

SHEPPARD, J.R. (1971); Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 68: 1316

SNELL, G.D. (1953); in "The physiopathology of Cancer" p. 338
(eds. Homburger und Fishman) P.B. Hoeber, N.Y.

SNELL, G.D. (1957); Ann. Rev. Microbiol., 11: 439

STEWART, C.R. (1972); J. Theor. Biol., 36: 639

STOKER, M.G.P. & RUBIN, H. (1967)
Nature 215: 171

STOKER, M.G.P. (1964); Virology 24: 165

STOKER, M.G.P., CLARKE, G.D. & THORNTON, M. (1971)
J. Cell. Physiol., 78: 345

TELLING, R.C. & ELSWORTH, R. (1965)
Biotechn. Bioeng., 7: 417

TELLING, R.C. & STONE, C.J. (1964)
Biotechn. Bioeng., 6: 147

TODARO, G.J., LAZER, G.K. & GREEN, M. (1965)
J. Cell. Comp. Physiol., 66: 325

TODARO, G.J., MATSUYA, Y., BLOOM, S., ROBBINS, A. & GREEN, M. (1967); in "Growth Regulating Substances for Animal Cells in Culture" (ed. Defendi u. Stoker)
Wistar Inst. Press Phil., p. 87

TÖDT, F. (1958); in "Elektrochemische Sauerstoffmessung"
De Gruyter, Berlin, p. 1

TSAO, G. T. (1968); Biotechn. Bioeng., 10: 765

URSPRUNG ed. (1968); "The Stability of the differenciated State" Springer, Berlin-Heidelberg-N. Y.

VESTERGAARD-BOGIND, B. (1962)
Scand. J. Clin. Lab. Invest., 14: 461

VOGT, M. & DULBECCO, R. (1960)
Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 46: 365

WALLACE, A. C. & ROSEN, N. J. (1960)
Acta Unio Internat. Cancr., 16: 315

WARBURG, O., GAWEHN, K. & GEISSLER, A. -W. (1958)
Zschr. Naturforsch., 13b: 61

WEINHOUSE, A., WARBURG, O., BURK, D. & SCHADE, A. L. (1956)
Science 124: 267

WEISS, R. A. (1970); Exp. Cell Res., 13: 1

WHITMORE, G. F. & GULYAS, S. (1966)
Science 151: 691

WIND, F. (1926); Biochem. Ztschr., 179: 384

WOODS, M. W., SANFORD, K. K., BURK, D. & EARLE, W. R. (1960)
J. Nat. Cancer Inst., 23: 1079

YEH, J. & FISHER, H. W. (1969)
J. Cell Biol., 40: 382

YERGANIAN, G. & LEONHARD, M. J. (1961)
Science 133: 1600

ZIMMER, H. G. (1969); Zeiss-Informationen 820, 0, p. 41

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Peter Schmialek, bin ich für die intensive Betreuung und seine großzügige und freundschaftliche Unterstützung dankbar.

Herrn Priv. -Doz. Dr. P. A. Bachmann und Herrn Dr. Dr. M. Schweiger danke ich für die hilfsbereite Unterstützung nach dem plötzlichen Tod von Herrn Prof. Schmialek.

Den Götzewerken in Burscheid danke ich für den kostenlosen Bau des Schalendrehtisches der Zählapparatur.

Lebenslauf

Am 27. Oktober 1947 wurde ich als Sohn des Oberingenieurs Hans Zapf und seiner Frau Stafanie geb. Devaux in Braunschweig geboren.

Von 1954 bis 1958 besuchte ich in Hannover die Volksschule und wechselte dann auf das Kaiser-Wilhelm-Gymnasium in Hannover über. Hier legte ich 1966 die Reifeprüfung ab.

Zum Sommersemester 1967 wurde ich an der medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin immatrikuliert.

Nach dem Staatsexamen im Februar 1973 war ich als Medizinalassistent in verschiedenen Berliner Kliniken und am Zentralinstitut für Biochemie und Biophysik tätig.

Das ECFMG-Examen legte ich 1974 ab. Seit Juni 1974 bin ich approbiert. Seit dieser Zeit bin ich bei Professor Dr. Schmialek am Zentralinstitut für Biochemie und Biophysik der FU Berlin als wissenschaftlicher Assistent tätig.